



Diversité des populations françaises d' Aphanomyces euteiches Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois: variabilité pathogène et moléculaire

Emmanuel Wicker

► To cite this version:

Emmanuel Wicker. Diversité des populations françaises d' Aphanomyces euteiches Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois: variabilité pathogène et moléculaire. Génétique des populations [q-bio.PE]. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, 2001. Français. NNT : . tel-01269995

HAL Id: tel-01269995

<http://hal.cirad.fr/tel-01269995>

Submitted on 5 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre:
N° de série:

THESE

présentée devant

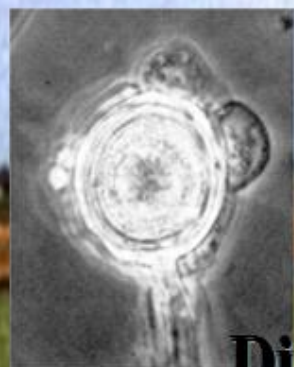
L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE L'ENSAR

Mention : Biologie et Agronomie

par

Emmanuel WICKER



Diversité des populations françaises d'*Aphanomyces euteiches* Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois : variabilité pathogène et moléculaire

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche "Biologie des
Organismes et des Populations appliquée à
la Protection des Plantes" (UMR BiO3P)
ENSAR-INRA Rennes-Le Rheu

Soutenue le 30 Mai 2001 devant le jury composé de :

C. NEEMA
A. PALLOIX
S. ROSENDAHL
G. THOMAS
Y. TIRILLY
J.-L. NOTTEGHEM
F. ROUXEL

Enseignant-chercheur INA-PG
Directeur de recherches INRA
Professeur (University of Copenhagen)
Professeur ENSAR
Professeur (Université de Brest)
Professeur ENSAM
Ingénieur de Recherche INRA,
Directeur de Thèse

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur,
Examineur,



N° d'ordre:
N° de série:

THESE

présentée devant

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE L'ENSAR

Mention : Biologie et Agronomie

par

Emmanuel WICKER

**Diversité des populations françaises d' *Aphanomyces*
euteiches Drechs., agent de la pourriture racinaire du pois:
variabilité pathogène et moléculaire**

Préparée à l'Unité Mixte de Recherche "Biologie des Organismes et des Populations appliquée
à la Protection des Plantes" (UMR BiO3P) ENSAR-INRA Rennes-Le Rheu

Soutenue le 30 Mai 2001 devant le jury composé de :

C. NEEMA	Enseignant-chercheur INA-PG	Rapportrice
A. PALLOIX	Directeur de recherches INRA	Rapporteur
S. ROSENDAHL	Professeur (University of Copenhagen)	Examineur
G. THOMAS	Professeur ENSAR	Examineur
Y. TIRILLY	Professeur (Université de Brest)	Examineur
J.-L. NOTTEGHEM	Professeur ENSAM	Examineur
F. ROUXEL	Ingénieur de Recherche INRA, Directeur de Thèse	Examineur

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été mené dans le cadre d'un programme de recherche financé par l'Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en Protéines (UNIP). Mes premiers remerciements vont donc à Benoît Carrouée et Frédéric Muel, pour m'avoir permis de valoriser ce contrat par cette thèse. Un grand merci également à Francis Rouxel pour avoir accepté de me suivre et m'encadrer tout au long de ces 3 ans, et m'avoir consacré quelques semaines de retraite active.

Le monde d' Aphanomyces est un vaste désert, peuplé de quelques glorieux vestiges du passé, et de ruines. Pas facile de faire son chemin dans ces conditions ! Il y a heureusement, dans ce désert, quelques valeureux pionniers qui ont balisé quelques pistes. J'ai eu la chance d'en rencontrer deux, que je remercie tout particulièrement pour leur aide désintéressée, leur science et leur grande sympathie. Grand grand merci à Earl T. Gritton, sans qui nous n'aurions pu, Martine Duparque et moi, ramener autant d'information et rencontrer autant de chercheurs lors de notre mission aux USA en Avril 1998, ainsi qu' à John M. Kraft, qui nous a considérablement apporté pour la suite de ce programme.

Je suis également particulièrement reconnaissant envers Søren Rosendahl, qui m'a accueilli dans son labo de l'Institut Botanique de Copenhague m'a initié à la technique AFLP, et a accepté de participer à mon jury de thèse. Ce séjour Danois restera dans ma mémoire comme un moment intense (au niveau du travail mais également de la bonne ambiance) ; je salue au passage Irène, Ann-Berith, Kenn et Kim.

Je n'aurais pu faire cette thèse sans l'aide de Martine Duparque, qui a (entre autres) rapatrié un nombre incalculable de génotypes résistants d'Outre-Atlantique, ce qui m'a permis de mettre au point la gamme différentielle ; merci également à toute l'équipe d'Amélioration des Plantes (Alain Baranger, Gérard Morin, particulièrement) pour les multiplications de matériel. D'autres non moins contributeurs de ce travail se trouvent au LNPV de Fleury-les-Aubrais : merci à Sandrine et Marie-Laure pour leurs souches, leurs résultats de piégeage.

Je voudrais témoigner ma grande gratitude à Anne Moussart, pour ses si nombreux coups de main, pour la gamme, la collection, les extractions, les palabres Aphano, les cafés matinaux, la bonne humeur toujours... Je souhaite d'avoir toujours une collègue comme toi !

Il y a également un grand nombre de gens qui ont participé de près ou de loin à cet édifice, et que je voudrais sincèrement remercier pour leur aide : Maurice Hullé, pour les analyses de données, Jean-Christophe Simon pour les discussions "bio des pop" et ses conseils, Didier

Andrivon et Alain Baranger pour les relectures de papier et discussions résistance, Maria Manzanarès, Bernard Tivoli et les membres du comité de thèse que je n'ai pas déjà cités: Luciana Parisi, JL Notteghem, Philippe Lucas. J'exprime toute ma reconnaissance à Claire Neema et Alain Palloix d'avoir été rapporteurs de cette thèse, ainsi que les membres de mon jury de thèse que je n'ai pas déjà cités : Yves Tirilly, Grégoire Thomas.

Et mes petites stagiaires qui m'ont abattu un sacré boulot et ont partagé avec moi les surprises plus ou moins bonnes que réserve souvent le champignon dont je vais vous exposer la vie et l'œuvre (!), bien sur que je ne les oublie pas ! Merci à Cathy, qui a passé du temps à dompter les monospores, et à Valérie, qui a ramé de longs mois en ma compagnie et pour qui les extractions d'ADN n'ont plus de secret ! Merci aussi à Fabian Pilet, entre autres pour les échanges de protocoles et conversations AFLP en tout genre, qui m'ont bien aidé à certains moments. Un grand merci également à Michèle Guibert, pour son aide dans les dernières manip.

Enfin, une dédicace spéciale au Portakabin Supa Crew, j'ai nommé René l'Ours-TopRonchon-Titou le roi de l'Uno et Seb the Ultimate. Vous m'avez rendu la rédaction vraiment chatoyante, et presque agréable à vivre (non !). Une pensée spéciale à Laurie, Morgane, et Anne-déjà citée, qui apportent un zeste de délicatesse dans ce monde de brutes. Merci également à ceux de la Station d'ex-Patho (trop nombreux pour être cités) qui contribuent à la bonne ambiance.

Dans tous les déserts, il y a une oasis de paix et de douceur. Merci à Patricia pour son soutien continu et sa patience, et à Raphaël pour son sourire, que je n'ai pas pu vraiment voir grandir ces derniers mois. Je remercie également tous mes amis et ma famille pour m'avoir soutenu durant ces trois ans.

Table des matières

PREAMBULE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1 DONNEES GENERALES SUR LA MALADIE ET L'AGENT PATHOGENE	3
1.1 <i>Aphanomyces euteiches</i> , un agent particulier parmi les parasites telluriques du pois	3
1.2 La pourriture racinaire à <i>Aphanomyces</i> ("aphanomyces root rot" ou "common root rot")	4
1.3 L'agent pathogène	6
1.4 Méthodes de lutte	13
2 VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE D'<i>A.EUTEICHES</i> ET RESISTANCE DU POIS	
2.1 Spécificité d'hôte (virulence sur Légumineuses)	15
2.2 La résistance du pois à <i>A. euteiches</i>	17
2.3 L'interaction <i>A.euteiches</i> /pois	24
2.4 Variabilité pathogène et génétique dans les isolats-population d' <i>A.euteiches</i>	25
3 STRUCTURATION DES POPULATIONS : QUEL STATUT POUR <i>A.EUTEICHES</i> PARMI LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES D'ORIGINE TELLURIQUE	
3.1 <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn	30
3.2 <i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.	31
3.3 Le complexe d'espèces <i>Phytophthora megasperma</i>	33
3.4 Conclusion – quel est le statut d' <i>A.euteiches</i>	34
4 INTERET DES MARQUEURS MOLECULAIRES DANS LES ETUDES DE DIVERSITE DES POPULATIONS	
4.1 Grands types de marqueurs- Principe	37
4.2 Quels marqueurs ? Pour quoi faire ?	40
4.3 Empreintes génétiques : RAPD ou AFLP ?	41

4.4 Utilisation de la technique AFLP	41
--------------------------------------	----

Problématique- présentation du sujet 48

Chapitre 1 : Spécificité d'hôte des populations françaises d' *A.euteiches*

INTRODUCTION	51
--------------	----

PARTIE I : Caractéristiques de pathogénicité d'isolats d'<i>Aphanomyces euteiches</i> issus de pois en France	53
Problématique	

Publication 1	55
----------------------	-----------

PARTIE II : La variabilité de spécificité d'hôte chez <i>A.euteiches</i> se retrouve-t-elle à l'échelle parcellaire	71
--	-----------

INTRODUCTION	71
--------------	----

2 MATERIELS ET METHODES	72
--------------------------------	-----------

2.1 Origine des isolats d' <i>A.euteiches</i>	72
---	----

2.2 Isolement, identification et entretien des isolats d' <i>A.euteiches</i>	74
--	----

2.3 Spécificité d'hôte sur différentes Légumineuses	74
---	----

3.RESULTATS	75
--------------------	-----------

3.1 Capacité de différentes Légumineuses à piéger <i>A.euteiches</i> dans une même parcelle	75
---	----

3.2 Spécificité d'hôte d'isolats d' <i>A.euteiches</i> issus d'une même parcelle	75
--	----

4.DISCUSION	76
--------------------	-----------

DISCUSSION-CONCLUSION	79
------------------------------	-----------

Chapitre 2 : Virulence sur pois des populations françaises d'*A.euteiches*

INTRODUCTION	82
PARTIE I : Mise au point d'une gamme différentielle de pois	84
Problématique	
Démarche	
Principaux résultats	
Publication 2	86
PARTIE II: Comportement spécifique des populations françaises d'<i>A.euteiches</i> en terme de virulence et agressivité sur pois	104
Démarche	
Principaux résultats	
Publication 3	106
DISCUSSION-CONCLUSION	120

Chapitre 3 : Analyse de la diversité génétique et structuration des populations d' *A.euteiches*

INTRODUCTION	122
1.MATERIEL ET METHODES	124
1.1 Matériel biologique	124
1.2 La culture du champignon	125
1.3 Extraction de l'ADN	126
1.4 Contrôle des ADN extraits	126
1.5 Réactions AFLP	127
1.6 Traitement des données moléculaires	131
1.7 Analyse des données	131
2.RESULTATS	135

2.1	Analyse phénétique globale des populations d' <i>A.euteiches</i>	136
2.2	Analyses multivariées	137
2.3	Structuration des populations d' <i>A.euteiches</i> par la spécificité d'hôte	138
2.4	Structuration des populations d' <i>A.euteiches</i> selon leur origine géographique	139
DISCUSSION		141
 Conclusion générale et perspectives		 146
 Références bibliographiques		 160
Annexes		179

Préambule

En pathologie végétale, une maladie déclarée résulte de la conjonction de trois facteurs rassemblés dans le « triangle de maladie » : la virulence et la capacité infectieuse d'un agent pathogène, la sensibilité ou réceptivité de son hôte végétal, et un environnement favorable à l'expression de la maladie (Agrios, 1988).

Il y a épidémie lorsque « la fréquence d'une maladie augmente brutalement dans une période de temps et dans un espace défini » (Rapilly, 1991). Certaines épidémies ont eu dans l'histoire des effets dévastateurs pour les cultures touchées, mais aussi indirectement pour la population humaine. L'un des exemples les plus connus et dramatiques concerne la soudaine épidémie de mildiou (*Phytophthora infestans*) qui a frappé les cultures de pomme de terre d'Europe continentale, puis des Îles Britanniques dans les années 1845-1846, provoquant la « Grande famine » d'Irlande et contraignant un million et demi d'Irlandais à l'exil (Agrios, 1988).

Parmi les facteurs pouvant expliquer le développement soudain d'épidémie sur un peuplement végétal donné, certains sont environnementaux, tels que le développement de conditions climatiques favorables à l'explosion de maladie, ou le changement de conditions culturales. D'autres sont directement liés à l'agent pathogène : introduction de souches virulentes, ou adaptation de populations endémiques à la culture-hôte. L'épidémie de mildiou évoquée plus haut, par exemple, aurait été causée par l'introduction en Europe d'un petit nombre d'individus provenant du Mexique.

Parmi les caractéristiques de l'agent pathogène importantes à connaître, deux caractéristiques sont primordiales : sa variabilité pathogène, et la structuration de ses populations. Ces deux caractéristiques permettent en effet de mieux comprendre l'épidémiologie de la maladie, à travers la nature et le nombre d'hôtes intermédiaires, l'existence et la fréquence de la phase sexuée dans la nature, la possibilité de dissémination à longue distance. Elles sont également le support de l'élaboration des stratégies de lutte les mieux adaptées à l'agent pathogène : raisonnement des rotations culturales, résistance variétale, entre autres.

La pourriture racinaire du pois provoquée par *Aphanomyces euteiches*, un champignon d'origine tellurique, est l'exemple typique d'une maladie épidémique éclatant brusquement, avec une très forte nuisibilité, sans moyen de lutte disponible. Décrite pour la première fois en France dans les années 1930, elle n'a posé de problèmes agronomiques importants qu'à

partir de 1993, mais provoque depuis des dégâts particulièrement importants chaque année, dans les principales zones de culture du pois.

Le travail présenté dans ce mémoire a eu pour objectif de mieux connaître les populations françaises d'*A.euteiches*, afin d'éclairer certains points de l'épidémiologie de la maladie, mais également de préparer la mise en place de stratégies de lutte adaptées, liées à la résistance variétale et aux rotations culturales notamment.

Dans une introduction bibliographique,

- nous présenterons en premier lieu les grandes caractéristiques de cette maladie, et de l'agent pathogène,
- nous accorderons un point particulier aux caractéristiques de sa spécialisation parasitaire et pathogène, sur Légumineuses et sur pois, ainsi qu'à la résistance du pois (sources, type de résistance) contre ce champignon,
- Dans le monde de la pathologie végétale, les parasites racinaires sont généralement beaucoup moins connus et étudiés que les pathogènes aériens. Les champignons pathogènes telluriques ont cependant un certain nombre de caractères spécifiques touchant à leur écologie, leur degré de spécialisation parasitaire, et leur structure de population. Trois exemples permettront d'illustrer ces spécificités, tout en remplaçant *A.euteiches* dans ce contexte.
- Une partie sera enfin consacrée aux outils d'analyse génétique des populations, donnant un aperçu des différentes techniques disponibles et de leurs champs d'application respectifs.

La présentation de notre travail de recherche, dont les objectifs seront détaillés plus loin, sera articulée en 3 chapitres :

- variabilité de spécificité d'hôte sur Légumineuses,
- variabilité de virulence et agressivité sur pois,
- structuration des populations, estimée par empreintes génétiques.

Synthèse bibliographique

1 DONNEES GENERALES SUR LA MALADIE ET L'AGENT PATHOGENE

1.1 Aphanomyces euteiches, un agent particulier parmi les parasites telluriques du pois

Les maladies racinaires du pois sont provoquées par de nombreux champignons du sol. Elles peuvent être réparties en quatre catégories (Hagedorn, 1984; Messiaen *et al.*, 1991; Maufras *et al.*, 1997a; Maufras *et al.*, 1997b):

- les fontes de semis, provoquées par *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani* (AG4 et AG5), et plus secondairement *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia sclerotiorum*. Elles sont généralement bien contrôlées par les traitements de semence,
- la pourriture racinaire précoce, provoquée par *Aphanomyces euteiches*, qui se manifeste dès un mois après le semis en conditions favorables,
- Le flétrissement précoce du pois (*Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*), fréquent aux Etats-Unis, maladie vasculaire qui n' a été signalée que sporadiquement en Champagne ; des attaques de *Sclerotinia sclerotiorum* peuvent également être observées sur pois potager (Messiaen *et al.*, 1991),
- les nécroses racinaires de fin de cycle, très fréquentes en France (Didelot *et al.*, 1994), provoquées par le "complexe parasitaire de fin de cycle" : *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, *F. oxysporum*, *Chalara elegans*, et plus secondairement par *F.culmorum*, *F. arthrosporoides* et *F.redolens* (Tu, 1987; Oyarzun & van Loon, 1989; Persson *et al.*, 1997).

La chronologie d'apparition des principales maladies racinaires sévissant en France est résumée sur la Figure S.1.

Parmi ces différentes espèces fongiques, *Aphanomyces euteiches* est reconnu comme l'agent pathogène le plus nuisible (Hagedorn, 1984; Persson *et al.*, 1997).

1.2 La pourriture racinaire à *Aphanomyces* ('*aphanomyces root rot*' ou '*common root rot*')

1.2.1 Historique

La pourriture racinaire du pois due à *Aphanomyces euteiches* Drechs. a été décrite pour la première fois aux USA dans les années 1920 (Jones & Drechsler, 1925), dans une région du Wisconsin où la culture du pois était intensive depuis 1889, date à laquelle s'étaient installées les premières usines de mise en conserve. Cette nouvelle maladie, s'exprimant préférentiellement en saison humide et douce, fut ensuite mise en évidence dans pratiquement toutes les zones productrices de pois des Etats-Unis (Papavizas & Ayers, 1974).

Cette maladie a été ensuite évoquée dans de nombreuses régions du monde, particulièrement en Amérique du Nord, Europe, Australie, Nouvelle-Zélande et Japon, sur pois mais également sur d'autres Légumineuses (Tableau S.1).

En Europe, *A.euteiches* est connu comme pathogène essentiellement sur pois (Oyarzun *et al.*, 1993; Bødker *et al.*, 1993), mais il a été isolé localement de symptômes de pourriture racinaire sur féverole en Angleterre (Salt & Delaney, 1986).

En France, il a été mis en évidence dès 1932 (Labrousse, 1933), mais n'a posé de problèmes significatifs qu'à partir de 1993 en Seine-et Marne, Eure et Eure-et-Loir, et ce uniquement sur les cultures de pois (Didelot *et al.*, 1994).

1.2.2 Symptômes de la maladie

Les symptômes sur pois se manifestent à deux niveaux, souvent dès le stade 3-4 feuilles.

- Sur la partie souterraine, on observe la présence de lésions molles et translucides sur les racelles dès 3-4 jours après infection, lésions qui évoluent en une pourriture brun-miel s'étendant sur tout le système racinaire et sur l'épicotyle.

A partir du début floraison, ces nécroses s'assombrissent, du fait de l'attaque des champignons du complexe parasitaire des racines (essentiellement *Fusarium solani* et *Phoma medicaginis* var. *pinodella*), et les racines et nodosités touchées se dessèchent.

L'épicotyle présente alors un étranglement caractéristique (Figure S.2).

A partir de la mi-floraison, *A. euteiches* n'est plus isolable à partir des racines, mais on peut observer les oospores caractéristiques du champignon dans le cortex des racines malades (Figure S.2) .

- Au niveau aérien, la maladie entraîne un nanisme et un dessèchement des plantes. A l'échelle de la parcelle, elle se manifeste dès le stade 5-6 feuilles par des zones de végétation vert pale, qui tournent rapidement au jaune en se tassant (« ronds jaunes »)(Figure S.2).

Lorsque l'attaque a eu lieu tôt en végétation, les plantes touchées ne fleurissent pratiquement pas et forment très peu de gousses.

1.2.3 Répartition de la maladie en France

Actuellement, la majeure partie des zones connues infestées restent localisées au Bassin Parisien : essentiellement Seine-et-Marne, Aisne, Eure et Eure-et-Loir, mais aussi dans une moindre mesure Oise, Somme, Marne, Loir-et-Cher.

D'autres foyers isolés sont également connus, en Bretagne, Charente-Maritime, Pyrénées Atlantiques, Centre, et plus récemment dans le Rhone et l'Isère (Figure S3).

Les zones infestées sont estimées à 4% des surfaces nationales de pois protéagineux, qui représentaient 466 000 ha en 2000 (Benoît Carrouée, UNIP, communication personnelle 2000).

Provoquant de graves dégâts en années favorables comme ce fut le cas en 1994 et surtout 1995 (chutes de rendement pouvant localement atteindre 100%), cette maladie est devenue l'une des grandes préoccupations de la filière pois, et ce d'autant plus que les surfaces touchées s'étendent et qu'aucun moyen de lutte n'est actuellement efficace.

Particulièrement préjudiciable sur pois protéagineux compte-tenu des surfaces touchées, la maladie est également redoutée des producteurs de pois de conserve, notamment en Bretagne.

1.3 L'agent pathogène

1.3.1 Classification

Le genre *Aphanomyces* (du grec *Aphano-* = imperceptible et *-myces* = champignon) a été décrit et établi par De Bary en 1860. Il est aujourd'hui rangé dans la classe des

Péronosporomycètes (ou Oomycètes), qui rassemble des hétérotrophes analogues de champignons, et se place dans le règne des *Straminiphila*, règne qui comprend aussi des algues unicellulaires et chromophiles (voir Patterson 1989, cité par (Hudspeth *et al.*, 2000)). D'après une étude récente de taxonomie morphologique, physiologique et moléculaire (analyse phylogénétique du locus COX2 du génome mitochondrial), *Aphanomyces* se trouve dans la sous-classe des *Saprolegniomycetidae*, ordre des Saprolegniales et famille des Saprolegniacées (Hudspeth *et al.*, 2000). Une étude phylogénétique des séquences du gène de la petite-sous-unité ribosomique (SSU rDNA) sur les Péronosporomycètes confirme ces classements (Riethmuller *et al.*, 1999). A titre de comparaison, les genres *Pythium* et *Phytophthora* se trouvent dans la sous-classe des *Peronosporomycetidae*, ordre des Pythiales. Une autre étude taxonomique et phylogénétique (Figure S.4) réalisée récemment sur la base de comparaisons de séquences des espaces internes transcrits (ITS) et de la grande sous-unité de l'ADN ribosomique (LSU rDNA) fait apparaître qu' *Aphanomyces* est l'un des genres les plus primitifs de la famille des *Saprolegniaceae* (Leclerc *et al.*, 2000).

Le genre *Aphanomyces* est sous-divisé en 3 sous-genres sur la base de l'ornementation des parois interne et externe de l'oogone (Scott, 1961) : les sous-genres *Axyromyces* et *Asperomyces* qui renferment les espèces aquatiques, et le sous-genre *Aphanomyces* comprenant les espèces pathogènes des racines des phanérogames, des poissons et crustacés. Le sous-genre *Aphanomyces* est composé de 32 espèces qui se distinguent par des caractéristiques morphologiques et pathogènes (Malvick *et al.*, 1998). Parmi ces espèces, sept sont reconnues comme étant phytopathogènes, provoquant des nécroses racinaires sur de nombreuses espèces (Tableau S.2).

L'espèce *A. euteiches* Drechs. a quant à elle été décrite à l'origine comme une espèce pathogène exclusive du pois (Jones & Drechsler, 1925), mais ce concept a été élargi à un certain nombre de Légumineuses ; la complexité de la variabilité pathogène de cette espèce sera exposée plus loin.

1.3.2 Caractéristiques morphologiques (Figure S.5) et cycle biologique d'*A.euteiches*

1.3.2.1 Le mycélium

Les hyphes aseptées ont un diamètre compris entre 4 et 10 µm, sont hyalines et faiblement ramifiées, avec des ramifications à angle droit et relativement courtes. Les hyphes jeunes

destinées à devenir des zoosporanges présentent des vacuoles réparties de manière irrégulière et un cytoplasme granulaire. Dans les hyphes plus âgées, une large vacuole centrale est entourée par le contenu cytoplasmique.

1.3.2.2 *Le stade asexué: les zoospores*

Les zoosporanges sont de type filamenteux, et constitués d'hyphes de 1 à 2 mm de long, dans lesquelles vont se différencier les spores asexuées. Le genre *Aphanomyces* est dit "diplanétique" ou "dimorphique" (Scott, 1961) car il produit deux types de zoospores : les zoospores primaires, différenciées en une seule rangée dans le sporange, sont évacuées et s'enkystent à l'orifice du zoosporange. C'est à partir de ces kystes que les zoospores secondaires biflagellées et d'aspect réniforme (13 µm de long, 7 à 8 µm de diamètre) sont formées.

1.3.2.3 *Le stade sexué: les oospores*

Les organes de reproduction, l'oogone ("femelle") et les anthéridies ("mâle"), se développent à partir du mycélium. Les anthéridies (une à cinq par oogone) sont généralement diclines, ont un diamètre compris entre 8 et 10 µm et une longueur de 15 à 18 µm avec des tubes de fertilisation visibles. L'oogone se forme à l'extrémité de courtes ramifications latérales d'une hyphe. De forme sub-sphérique, elle a un diamètre compris entre 25 et 35 µm. A maturité, la paroi de l'oogone a une épaisseur de 1 à 2.5 µm. Chaque oogone renferme une "oosphère" qui donnera après fertilisation l'oospore. Cette dernière est hyaline, de forme sub-sphérique ou plus rarement ellipsoïdale. Les oospores ont un diamètre compris entre 20 et 23 µm, sont délimitées par une paroi d'épaisseur uniforme (1.2 à 1.8 µm) et leur contenu est composé en leur centre d'un large globule huileux entouré de matériel granulaire.

Le cycle biologique des Saprolegniacées est diploïde ; la seule phase haploïde, très courte, est observée dans les anthéridies et oogones, juste avant la caryogamie (Flanagan, 1970; Ellzey, 1974).

A. euteiches est homothallique, c'est-à-dire capable de former des oospores en culture pure, toutes issues d'autofécondation, après 5 à 7 jours d'incubation. L'équipe de C.R. Grau (University of Wisconsin-Madison, USA) a cependant démontré récemment, par le croisement réussi d'un pathotype "pois" avec un pathotype "haricot" (Shang *et al.*, 2000a),

qu'un certain degré d'hétérothallisme existe. On ne sait cependant rien de l'importance des phénomènes d'hétérothallisme en conditions naturelles.

1.3.3 Cycle infectieux –épidémiologie (Figure S.6)

1.3.3.1 *L'inoculum primaire*

Bien que très peu de travaux aient porté sur la survie d' *A. euteiches* dans le sol, les quelques données existantes suggèrent que le mycélium joue un rôle mineur : Lockwood (1960) (cité par (Papavizas & Ayers (1974)) a ainsi montré que les hyphes d' *A. euteiches* sont très rapidement lysées et détruites en sol naturel. Quant aux zoospores, leur viabilité dans le sol a été estimée à 5 à 6 jours (Haensler, 1927, cité par Papavizas & Ayers (1974)). L'inoculum primaire serait donc constitué essentiellement d'oospores, présentes dans les racines de la culture-hôte précédente ou à l'état libre dans le sol. Ces spores de repos ont une durée de vie particulièrement longue (10 à 20 ans dans le sol (Maufras *et al.*, 1997b)), et une grande résistance aux conditions extrêmes (viables et infectieuses après 2 ans d'alternances gel-dégel, et de séjour continu à -20°C (Papavizas & Ayers, 1974)).

De nombreux auteurs ont également postulé que la pérennité d' *A. euteiches* dans le sol serait assurée non seulement par la longévité de ses oospores, mais aussi par sa capacité à parasiter de nombreuses autres espèces (Légumineuses sauvages telles que la dolique, le trèfle doux ; adventices non-Légumineuses), en tant que parasite facultatif, pour renouveler et revitaliser son inoculum (Papavizas & Ayers, 1974). Cependant, aucune étude n'a apporté la preuve directe de l'implication de ces hôtes secondaires dans la survie du champignon en sol naturel. Seuls Chan & Close (1987) ont montré que des isolats issus de pois étaient capables d'infecter sans symptômes 3 adventices (*Capsella bursa-pastoris*, *Viola arvensis* et *Stellaria media*) en conditions naturelles, et constituer ainsi un inoculum primaire capable d'attaquer la culture de pois suivante.

1.3.3.2 *Processus infectieux d'A.euteiches chez le pois*

1.3.3.2.1 De l'oospore à la plante

Le cycle débute par la germination de l'oospore, formant un sporange filamenteux, ou une hyphe mycélienne suivant les conditions dans le sol. Cette germination serait dépendante de composés spécifiques présents dans les exsudats racinaires, mais peut-être également à la surface même de la racine chez le pois ou une autre culture sensible (Shang *et al.*, 2000b).

C'est ce qui pourrait expliquer que les germinations soient supérieures au contact des racines des hôtes préférentiels, les oospores des isolats issus de haricot germant par exemple préférentiellement sur leur hôte d'origine, tandis que les isolats provenant de pois germent sur pois et haricot.

Le sporange issu de l'oospore primaire se différencie, et libère les zoospores nageuses, considérées comme l'unité infectieuse du parasite. Il est admis qu'une oospore ne donne naissance qu'à un sporange, capable de libérer 300 à 400 zoospores (Malvick & Percich, 1998b). Ces zoospores ont besoin d'eau libre pour se déplacer jusqu'à la plante. L'infection ne peut donc être déclenchée qu'à la faveur de précipitations ponctuelles mais importantes, qui laissent le sol saturé en eau pendant quelques heures. La température minimale de sporulation reste inconnue (Llanos & Lockwood (1960) ont observé au laboratoire une très faible sporulation à 16°C), il en est de même pour la quantité minimale d'humidité nécessaire à l'infection.

Les zoospores d'*A. euteiches* ont la capacité de s'enkyster si elles n'ont pas trouvé de site d'infection, puis de réémettre une nouvelle spore nageuse plus tard (Deacon, 1996), et ce sur 3 cycles (Cerenius & Söderhall, 1985).

La température optimale d'infection est de 16°C, alors que celle d'expression des symptômes est de 28 °C (Papavizas & Ayers, 1974).

1.3.3.2.2 Contact et pénétration dans les racines

Les zoospores sont attirées par chimiotactisme par les racines de la plante hôte et s'accumulent préférentiellement au voisinage immédiat de la zone d'élongation racinaire située immédiatement après la coiffe et dans des zones localisées des racines (Cunningham & Hagedorn, 1962a; Deacon & Saxena, 1998). Aucune corrélation n'a été établie entre l'attraction des zoospores et la sensibilité des plantes à l'infection par *A. euteiches* (Papavizas & Ayers, 1974). Au contact de la racine, les zoospores s'immobilisent, perdent leurs flagelles et s'enkystent après reconnaissance de composés pariétaux de la plante-hôte. Elles germent après 30 à 40 minutes, en utilisant du calcium et des nutriments libérés par la plante (Deacon & Saxena, 1998). Le tube germinatif initial est étroit, pour favoriser la pénétration de l'hôte; il se développe ensuite sous la forme d'une hyphes assimilatrice de nutriments, qui progresse de manière intercellulaire dans les premières heures, puis de manière inter- et intracellulaire.

1.3.3.2.3 Progression dans les racines – Reproduction sexuée

Les hyphes inter- et intracellulaires progressent rapidement dans les tissus racinaires : 61 heures après le début de l'infection, l'ensemble du cortex est colonisé. Cette rapide progression et les symptômes de macération observés ont suggéré l'existence d'une hydrolyse enzymatique des tissus de la plante-hôte. Des travaux ont ainsi montré qu'*A. euteiches* produisait *in vitro* et dans les tissus de la plante hôte, une polygalacturonase et une cellulase pouvant participer à l'hydrolyse de la paroi pecto-cellulosique (Ayers *et al.*, 1969a et b). Comme le soulignent la plupart des études effectuées (Papavizas & Ayers, 1974) à l'exception des travaux de Cunningham et Hagedorn (1962b), il semble que le cylindre central soit moins sensible à l'infection et puisse rester fonctionnel pendant quelques temps.

Les premières oogones sont formées dès le 4^{ème} jour après infection, et la reproduction sexuée a lieu très rapidement. De nombreuses oospores apparaissent alors dans les tissus corticaux des racines et de l'épicotyle.

Par observation de l'activité phosphatase alcaline fongique dans les racines, Kjølner et Rosendahl (1998) ont montré que les hyphes colonisent très rapidement les tissus, mais ne sont métaboliquement actives que peu de temps ; leur activité diminue au fur et à mesure que les oospores apparaissent. Selon ces auteurs, *A. euteiches* peut être considéré comme un parasite biotrophe, car les hyphes ne paraissent actives que lorsque les tissus racinaires sont vivants. Lorsque les symptômes commencent à s'exprimer au niveau aérien, l'agent pathogène serait déjà végétativement inactif.

Cette faible durée de la phase active du mycélium (d'autant plus faible que la pression d'inoculum est forte) pourrait expliquer l'inefficacité des traitements fongicides de semence ou des antagonismes microbiens testés sur ce modèle (Kjølner & Rosendahl, 1998), ainsi que l'impossibilité d'isoler le champignon lorsque le cycle cultural est déjà bien avancé, vers la fin floraison.

Ceci suggère que les composantes de résistance les plus efficaces devraient concerner les phases les plus précoces de l'interaction : inhibition de germination des oospores, lyse des zoospores ou inhibition de germination des kystes avant pénétration. Parmi les autres composantes efficaces *a priori*, figurent également celles qui permettraient au cylindre central de rester fonctionnel, et d'assurer l'alimentation en eau et nutriments pendant la période la plus critique pour la plante.

Les oospores enchassées dans les racines de pois constituent l'inoculum primaire qui servira à l'infection de la culture suivante.

En revanche, l'existence de contaminations secondaires, ainsi que le nombre de générations d'oospores produites par an, sont inconnus. D'après Pfender et Hagedorn (1983), cette maladie ne serait pas unicycle, les racines malades émettant des sporanges et zoospores secondaires. Mais selon les experts de terrain, il n'est pourtant pas rare de voir des cultures de pois malade reverdir après des pluies importantes, alors que ces pluies devraient déclencher un nouveau cycle de maladie et des symptômes plus importants.

1.3.3.3 Dissémination

La dissémination d'*A. euteiches* à courte distance peut se produire par le contact de racine à racine, et peut-être par les sporulations secondaires à partir de tissus fraîchement atteints. Mais les distances ainsi parcourues n'excèderaient pas la quinzaine de centimètres (Pfender & Hagedorn, 1983).

Le ruissellement est un facteur important de dissémination, en particulier sur les parcelles en pente, ainsi que le type de sol: les zoospores se disperseraient plus facilement dans les sols sableux que dans les sols argileux (McDonald, 1997).

La dissémination à longue distance (d'un champ à l'autre dans une exploitation ou une région) aurait pour origine principale les transports de terre contaminée par les outils destinés au travail du sol, ou par les transplantations de plants de pois, pratiquées aux Etats-Unis dans les années 1940 –1950 pour inoculer les sols en *Rhizobium*. Par contre, on peut considérer que la dissémination par le vent est négligeable, les zoospores et oospores n'étant trouvées que dans le sol (Papavizas & Ayers, 1974).

Aucun cas de contamination par la semence n'a été signalé. Des essais menés par le SRPV Centre en 1995 (à partir de lots de graines provenant de zones très contaminées) ont conclu à l'absence de transmission par la semence.

1.3.3.4 Le pathosystème *A. euteiches* / pois –Une exception à la théorie de Cruickshank ?

La pisatine, qui fait partie des phytoalexines produites par le pois, est considérée comme l'un des facteurs de résistance du pois aux agents pathogènes, suite aux travaux de l'équipe de Cruickshank (Cruickshank, 1962; Cruickshank & Perrin, 1963). Ces travaux indiquaient en effet que chez un hôte résistant, l'infection stimule la production de phytoalexine jusqu'à une concentration supérieure au seuil d'inhibition de la croissance du champignon pathogène. La

sensibilité de l'hôte serait due à l'incapacité de l'agent pathogène à induire la synthèse de phytoalexine caractéristique de l'hôte, ou à la capacité du pathogène à tolérer cette molécule, à réprimer sa synthèse, ou à s'échapper de l'environnement contenant le composé.

A. euteiches a la particularité d'être très sensible à cette molécule *in vitro*, mais absolument insensible *in planta*, alors que les principaux autres agents pathogènes du pois (*Ascochyta spp.*, *Mycosphaerella pinodes*, *Fusarium solani* f.sp. *pisi*) y sont tolérants dans les deux conditions (VanEtten, 1973). Lors d'une expérience réalisée *in situ*, les symptômes se développèrent rapidement durant 5 jours, alors que la concentration de pisatine dans les tissus avait atteint, dès la 36^{ème} heure après inoculation, une valeur 8 fois supérieure à celle inhibant le développement fongique *in vitro* (Pueppke & VanEtten, 1974), prouvant par ailleurs que le pathogène ne réprimait pas l'accumulation de pisatine. L'expansion des symptômes d'*A.euteiches* était par ailleurs plus rapide que celle des nécroses de *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, champignon pourtant tolérant à la pisatine *in vitro* comme *in vivo*.

L'hypothèse d'une détoxification de la pisatine par *A.euteiches* semblait peu vraisemblable, car toutes les espèces capables de détoxifier cette molécule y sont tolérantes *in vitro*. Des essais plus poussés (Pueppke & VanEtten, 1976) ont ensuite montré que la pisatine se trouvait pourtant bien dans les mêmes compartiments cellulaires que l'agent pathogène (la croissance d'*A.euteiches* est exclusivement intercellulaire dans les premières phases de l'infection), que l'agent pathogène ne dégradait pas la pisatine et n'y devenait pas tolérant lorsqu'on l'exposait à des doses faibles. Enfin la pisatine préformée dans les tissus avant infection (par irradiation des épicotyles) n'inhibait en aucune manière son développement dans les tissus.

Cette exception à la théorie de Cruickshank a trouvé un début d'explication par l'implication démontrée de lipides polaires extraits de pois dans l'accroissement de la tolérance *in vitro* d'*A.euteiches* à la pisatine, bien que cet effet protecteur ne soit pas hautement spécifique (efficace sur des non-pathogènes du pois). Ces lipides polaires provenant de l'hôte pourraient induire un mécanisme de tolérance n'impliquant pas la dégradation de pisatine, inactiver ou couvrir un site de fixation potentiel de la pisatine sur les hyphes du champignon, ou encore être utilisés par le champignon pour modifier sa membrane, ou réparer les dégâts dus à la phytoalexine (Sweigard & VanEtten, 1987). Le rôle de ces lipides polaires dans l'interaction *A.euteiches*/pois n'a malheureusement pas été précisé depuis ces travaux.

1.4 Méthodes de lutte

1.4.1 Prévision des risques : prophylaxie

C'est la seule méthode de lutte efficace actuellement.

Un test de détection d' *A. euteiches* à partir du sol a été développé par le LNPV Centre en 1994.

Les producteurs de pois désireux de connaître le risque de maladie adressent au laboratoire un échantillon de sol, représentatif de la parcelle concernée. Le test, réalisé aux conditions optimales pour le développement de la maladie (25°C, obscurité, 90% de la capacité de rétention), est basé sur l'estimation du potentiel infectieux du sol exprimé sur un semis de pois sensible (variété Baccara), sur une durée de 13 jours. La réponse est donnée au producteur sous forme de présence ou absence de risque de maladie (Didelot & Chaillet, 1995; Orlando *et al.*, 1999).

1.4.2 Lutte chimique

Malgré les recherches en cours, les divers traitements fongicides de sol et de semence, testés entre autres par l'ITCF, se révèlent inefficaces.

Seul le Tachigaren® aurait un effet réducteur sur la maladie, mais à des doses très fortes, économiquement non envisageables.

Certaines publications américaines de la fin des années 1970 évoquaient également l'impact des herbicides de la famille des toluidines (trifluraline, oryzaline) sur le potentiel infectieux (Grau, 1976; Grau & Reiling, 1977; Jacobsen & Hopen, 1981), mais ces travaux n'ont pas débouché dans la pratique.

1.4.3 Itinéraires techniques et rotations culturales

L'impact des amendements inorganiques (éléments minéraux, oligo-éléments), cité par des articles des années 1960, est controversé (Papavizas & Ayers, 1974).

En revanche, beaucoup d'espoir est placé sur l'effet suppressif de certains précédents culturaux, dont l'avoine et les Crucifères. Les débris de culture d'avoine libéreraient des saponines, qui lysaient les zoospores. L'équipe de V.A. Fritz (Université du Minnesota) est très active sur ce domaine (Fritz *et al.*, 1995; Williams-Woodward *et al.*, 1997).

Les résidus de culture de Crucifères, quant à eux, libéreraient des composés volatils dans le sol (sulfures, isothiocyanates), qui réduiraient la mobilité des zoospores (Papavizas & Ayers,

1974; Smolinska *et al.*, 1997a,b). La moutarde blanche et le chou semblent être les espèces les plus efficaces (Muehlchen *et al.*, 1990).

Enfin, certains sols présentent une faible réceptivité à la maladie, empêchant celle-ci de se développer (Oyarzun *et al.*, 1997; Wicker & Rouxel, 1998; Persson *et al.*, 1999). Les résultats des travaux les plus récents conduits en Suède impliqueraient la fraction abiotique des sols dans cette résistance (ou suppressivité) (Persson & Olsson, 2000), mais dans d'autres situations, et notamment en France, aucun lien n'a pu être établi entre caractéristiques physico-chimiques et suppressivité (Wicker & Rouxel, 1998).

1.4.4 Lutte biologique

Plusieurs pistes ont été explorées :

Deux bactéries antagonistes ont été isolées et étudiées aux USA par l'équipe de JL Parke : *Burkholderia cepacia* sct AMMD (Heungens & Parke, 2000) et *Pseudomonas fluorescens* sct PRA25. Ces bactéries, par ailleurs stimulatrices de la croissance racinaire (Parke, 1990; Parke *et al.*, 1991; King & Parke, 1993; King & Parke, 1996), ont été brevetées par Good Bugs, mais n'ont pas encore été homologuées sur le marché américain (CR Grau, comm. personnelle 1998).

Le KODIAK™, une formulation à base de *Bacillus subtilis* produite par Gustavson Inc., semble également donner des résultats prometteurs aux Etats-Unis (JM Kraft, comm. personnelle 1998), tandis qu'une publication évoque l'antagonisme dû à un champignon, *Trichoderma harzianum* ThzID1 (Dandurand & Knudsen, 1993).

Des endomycorhizes du genre *Glomus* sont également étudiées pour leur antagonisme : *Glomus fasciculatum* (Rosendahl, 1985) et surtout *Glomus mossae*, qui a fait l'objet de thèses à l'Université de Copenhague (Kjøller, 1998) et à l'INRA de Dijon (Slezack, 1999).

Mais parmi ces différents microorganismes, aucun ne semble pouvoir apporter de solution au problème *Aphanomyces* dans un avenir proche.

1.4.5 Lutte génétique

Cette piste reste l'une de plus prometteuses, bien qu'aucune variété de pois résistante à *A.euteiches* ne soit actuellement sur le marché. Seule Capella (Svalöf Weibull), qui possède un certain degré de tolérance, est inscrite au catalogue suédois.

2 VARIABILITE DU POUVOIR PATHOGENE D'*A.EUTEICHES* ET RESISTANCE DU POIS

2.1 *Spécificité d'hôte (virulence sur Légumineuses)*

Papavizas et Ayers ont soulevé dès 1974 la difficulté d'établir clairement la signification de "spécificité d'hôte" chez *Aphanomyces euteiches*. Cette espèce a été déclarée parasite sur de très nombreux hôtes : pas moins de 19 familles botaniques sont évoquées, dont les Légumineuses, mais aussi certaines Graminées, Crucifères, Solanacées, d'après des tests en conditions contrôlées en sol stérile (Papavizas & Ayers, 1974).

Concernant les Légumineuses, *A.euteiches* a été isolé du champ sur pois, mais aussi sur haricot (Pfender & Hagedorn, 1982), luzerne (Delwiche *et al.*, 1987; Beghdadi *et al.*, 1992), trèfle rouge (Tofte *et al.*, 1992), trèfle souterrain en Australie (Greenhalgh & Merriman, 1985), féverole au Canada (Lamari & Bernier, 1985) et en Grande-Bretagne (Salt & Delaney, 1986).

En 1981, Pfender et Hagedorn établissent l'existence dans le Wisconsin de deux formes spéciales : *A.euteiches* f.sp. *pisi* est capable d'infecter le pois et plus faiblement le haricot, alors que *A.euteiches* f.sp. *phaseoli* est strictement inféodé au haricot. Chez cette dernière forme spéciale, les oospores sont plus petites, avec un caractère aplérotique (différence entre les diamètres de l'oogone et de l'oospore) plus marqué, et la croissance sur milieu gélosé est fortement ralentie à partir de 28°C.

Mais les études qui suivent (Holub *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998) sont plus nuancées : la forme spéciale *phaseoli* semble acceptée mais pas la forme spéciale *pisi* : les isolats issus de pois sont en effet capables de provoquer des symptômes sur haricot, luzerne, trèfle, bien qu'ils soient moins agressifs que sur pois.

Des croisements de pathotypes "pois" (très pathogène sur pois, peu sur haricot) et pathotypes "haricot" (très pathogène sur haricot, non-pathogène sur pois) au laboratoire ont été réussis, mais les rares hybrides vrais obtenus (caractérisés par RAPD) sont de phénotype "pois", et non "pois-haricot" (Shang *et al.*, 2000a).

La Figure S.7 résume l'état actuel des connaissances sur la spécialisation des populations américaines d' *A. euteiches*, suite aux tests de pouvoir pathogène et à la caractérisation moléculaire de Malvick *et al.* (1998). D'après ces marqueurs, les souches du pathotype "haricot" apparaissent comme les plus différenciées, suivies des pathotypes "luzerne/trèfle" (A/C) et "luzerne" (A). Les souches du pathotype "pois/luzerne" ne se

différencient pas, mais se répartissent dans les deux derniers groupes. Les souches "non-pathogènes"(Avr) semblent génétiquement plus proches de l'espèce *A. cochlioides* (pathogène de la betterave) que des autres *A. euteiches*. Dans le pathotype "luzerne" ont été caractérisées deux races, d'après la virulence sur la population-multilignée WAPH-1 (Grau *et al.*, 1991; Munkvold *et al.*, 2001).

Des attaques d'*A.euteiches* ont été par ailleurs décrites sur féverole, principalement dans le Manitoba (Canada). Une souche isolée d'une parcelle particulièrement touchée s'est montrée très pathogène sur féverole, modérément pathogène sur lentille et pois, non pathogène sur haricot (Lamari & Bernier, 1985). Plus récemment, un isolat piégé sur féverole aux Etats-Unis s'avère en fait très pathogène sur pois, luzerne, féverole et trèfle (Grau *et al.*, 1991).

En Europe, deux "races" du champignon ont été identifiées sur le site de Rothamstedt (Angleterre) : l'isolat issu de pois est pathogène sur pois mais pas sur féverole ; l'isolat issu de féverole, est quant à lui très agressif sur féverole, moins sur haricot commun, et non-pathogène sur pois (Salt, 1988). Les études conduites en Hollande pour tester la pathogénicité du champignon sur pois, féverole et haricot ont montré qu' *A.euteiches* n' y attaquait que le pois (Oyarzun *et al.*, 1993).

Malheureusement, aucune description morphologique, biochimique ou moléculaire, prenant en compte les précédentes caractérisations et souches-types décrites (Pfender & Hagedorn, 1982; Holub *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998;), n'a été menée à ce jour pour tenter de mieux définir le statut de ces souches (qui n'ont d'ailleurs été enregistrées dans aucune mycothèque internationale).

Enfin, Holub *et al.* (1991) ont observé que les rotations culturales ont un effet sur la spécificité d'hôte des populations pathogènes d'*A.euteiches* : en rotation pois-luzerne, ces auteurs ont trouvé des isolats virulents sur ces 2 hôtes, alors qu'en monoculture de luzerne, les isolats sont plus spécialisés sur luzerne. Mais aucune étude n'a été entreprise pour expliquer ce phénomène.

2.2 La résistance du pois à A. euteiches

2.2.1 Historique-sources de résistance

Les travaux de recherche de cultivars de pois résistants à *A.euteiches* ont commencé dès les années 1930 dans le Nord des Etats-Unis (essentiellement dans le Wisconsin). Mais c'est vers 1950 (Papavizas & Ayers, 1974) que les études se sont intensifiées.

L'analyse de la littérature et la mission que nous avons effectuées aux USA en 1998 nous ont montré que chacune des équipes impliquées dans cette lutte génétique a eu pendant longtemps des sources de résistance et une démarche de sélection bien spécifique. C'est pourquoi nous choisissons ici de présenter chacun de ces groupes de recherche, avec ses sources de résistance, sa démarche et ses résultats, ce qui nous permettra de mieux comprendre notre propre démarche dans l'étude de caractérisation de la virulence d'*A.euteiches* sur pois. Nous parlerons ensuite du déterminisme génétique et des critères de notation de la résistance.

2.2.1.1 Les équipes de sélection

2.2.1.1.1 Université du Michigan et Etat de New-York (Lockwood et Ballard, Marx)

C'est durant les années 1950 qu'est mené le premier criblage massif de matériel (805 lignées testées contre *A. euteiches*), fondé sur une notation de symptômes à trois échelles : sur racines, épicotyle et parties aériennes (Lockwood & Ballard, 1960). Plusieurs lignées sont alors distinguées, parmi lesquelles PI166159, PI180693 (que d'autres auteurs vont ensuite utiliser), qui ne sont en fait que partiellement résistantes.

La résistance, dans ce matériel, se manifeste surtout sur l'épicotyle et les parties aériennes : alors que les racines sont toujours malades, les parties aériennes flétrissent plus lentement et les épicotyles sont moins attaqués.

L'équipe du Dr Marx, de Geneva (NY) travaille quant à elle de 1951 à 1963, sur la résistance globale au stade plantule, en notant la mortalité de plantes. Au terme de leurs travaux, Marx *et al.* (1972) établissent (d'après les études des descendance du croisement entre PI175227, résistant/tolérant, et V213, sensible) que la résistance étudiée ici est dominante, avec une forte composante environnementale, et qu'elle est liée à 3 allèles de type sauvage (Le : grands entrenoeuds, A : fleurs colorées, PI : hile noir) qui contribuent séparément à la résistance. Ces auteurs ne savent pas alors pas si les trois loci sont dans la même zone du génome, et si la résistance est associée à un ou plusieurs gènes.

2.2.1.1.2 Université du Minnesota-St Paul

Durant les années 1960, les sélectionneurs de l' Université de Saint Paul suivent la démarche globale de Lockwood.

Haglund & King (1961), en travaillant sur le critère "mortalité de plantes", mettent en évidence la résistance de Mn494-A1. Puis apparaissent les lignées Mn494-A4, Mn494-A9, Mn494-A11 (Kraft, 1981).

King & Cho (1962) et Morrison *et al.*(1971) mettent également en évidence une première composante de résistance, en remarquant que les racines des lignées résistantes renferment moins d'oospores d' *A. euteiches* que celles des sensibles. Le comptage d'oospores dans les racines devient ainsi un autre critère de notation de résistance, malheureusement lourd à mettre en oeuvre.

Durant les années 1970, Shehata et Davis travaillent sur de nouvelles techniques de criblage (Shehata *et al.*, 1976). Ils proposent ainsi une technique de "changement environnemental" (Environmental Shift Technique ou EST) fondée sur la succession d'une phase favorable au pathogène (4 à 7 jours en humidité saturante à 26°C) et d'une phase favorable à la plante (humidité plus faible, lumière plus forte, température plus fraîche), qui permet d'allier une forte pression de sélection en première phase à la possibilité de récupérer des graines de cultivars résistants en seconde phase.

La lignée **Mn108** est ainsi sélectionnée (Davis *et al.*, 1976), qui allie résistance partielle et caractères agronomiques intéressants : fleurs blanches, faible taille. Elle a également la particularité de former plus de racines adventives que les autres génotypes au stade juvénile. En 1983, Shehata, Davis et Pflieger (1983a) s'orientent vers une EST modifiée où l'évaluation du niveau de résistance se fait par le niveau de symptômes racinaires ; ils démontrent également le caractère polygénique de la résistance. D'après des croisements Mn108 x sensible, ils constatent que les faibles indices de maladie et le nombre de racines adventives sont deux critères hérités indépendamment (Shehata *et al.*, 1983b).

A l'issue de cette démarche émerge la nécessité de lancer un programme de sélection récurrente, pour cumuler des effets mineurs de résistance et ainsi améliorer le niveau global. Ces mêmes chercheurs s'orientent donc vers la sélection généalogique à partir des parents Mn494-A11 et Mn108, auxquels ils ajoutent ensuite une lignée de JM Kraft (792022). Ils alternent sélection au champ (sur des notations visuelles de mortalité), et en serre, sur des notations de symptômes racinaires (indice de maladie) et de perte de biomasse aérienne et racinaire (comparaison à un témoin non inoculé). C'est à l'issue de ces études que sont publiés

en 1995 les lignées MN313, MN314 et MN144 (Davis *et al.*, 1995). La généalogie des lignées de Davis est résumée sur la Figure S.8.

2.2.1.1.3 Université du Wisconsin (E.T. Gritton)

C'est le Dr Earl Gritton qui a mené l'essentiel du travail de sélection contre *A. euteiches*, en partant de géniteurs de résistance fournis pour partie par le Dr Marx. On sait peu de choses de ses recherches durant les années 1970, sinon qu'il pratique la mutagenèse par l'éthyl-méthyl-sulfonate sur des protoplastes de pois, dans l'espoir d'obtenir des mutants tolérants ou résistants à *A. euteiches*. Certains génotypes intéressants de ce programme (B5099, et B5762) sont d'ailleurs incorporés dans certaines lignées de JM Kraft (Kraft, 1989b).

En 1985, Gritton lance un programme de sélection récurrente phénotypique, pour améliorer la résistance globale à *Aphanomyces* dans les pois de congélation et de conserve, mais aussi favoriser les caractères « fleurs blanches », « grains verts ridés », une croissance déterminée, un feuillage afila, et la résistance à l'oïdium (*Erysiphe polygoni*) qu'il a commencé à étudier à partir de 1970 (Lewis & Gritton, 1988, 1992). Sa population de base est ainsi constituée de 12 lignées, dont les sources de résistance Mn108, 494-A11 et NY5, une lignée de Geneva, NY. Ce programme est basé sur une alternance de sélection au champ (pourcentage de survie, indice de nécrose, rendement sec) et croisement et sélection en serre (indice de nécrose, pourcentage de poids entre inoculé et témoin non inoculé).

Gritton publie ainsi 5 lignées en 1990 : WI8901, WI8902, WI8903, WI8904, WI8905 (Gritton, 1992). D'autre part, il commence à étudier d'autres techniques de criblage avec C.R.Grau, et publie un essai de sélection en conditions aéroniques (Rao, 1994; Rao *et al.*, 1995) ; par cette technique, la cinétique d'apparition des symptômes peut être parfaitement suivie. Mais la lourdeur et la technicité de ce dispositif le rend inadéquat pour des programmes de tri de matériel.

En 1996, le programme de sélection s'arrête avec le départ en retraite de Gritton. Tout son matériel (lignées WI9401, 9402, etc..., 5^{ème} et 8^{ème} cycle de sélection récurrente) est distribué (Gritton, 1995). La majeure partie est ainsi importée en France (INRA, GSP). La généalogie des lignées de Gritton est récapitulée sur la Figure S.9.

2.2.1.1.4 Equipe de Prosser, Etat de Washington (J.M. KRAFT)

C'est John M. Kraft qui est à l'origine de ce programme de sélection.

Dès le début des années 1960, il sélectionne pour la résistance aux nécroses racinaires, fusariose vasculaire et fontes de semis : *Fusarium solani* f.sp. *pisi*, *F. oxysporum* f.sp. *pisi*, *Pythium ultimum* (Kraft *et al.*, 1972; Kraft *et al.*, 1994). Il s'attache donc à cumuler le phénotype "afila" (af/af) et la résistance à *Fusarium oxysporum* (dont le déterminisme génétique est connu), à *F. solani* et à *Pythium ultimum*, mesurée par la différence de rendement en conditions infestées, ainsi que la résistance au "pea-seedborne mosaïc virus" (PSbMV) et au "pea enation mosaïc virus" (PEMV).

Il sort ainsi en 1981 la lignée 792022, à fleurs blanches (Kraft, 1981).

C'est durant les années 1980 qu'il commence à travailler également sur *Aphanomyces euteiches* en sélectionnant sur l'indice de nécrose et le pourcentage de poids frais inoculé/non inoculé en serre, le rendement au champ (Kraft, 1989a; Kraft *et al.*, 1994).

Il publie ainsi

- en 1989 : 86-638, 86-2231 et 86-2236, à fleurs blanches et partiellement résistantes à *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium solani* (Kraft, 1989b)
- en 1992 : 90-2079 résistante à *A. euteiches*, 90-2131 et 90-2322 résistante/tolérante à *A. euteiches* et *F. solani* (Kraft, 1992)
- en 2000 : 96-2052, 96-2058, 96-2068, 91-2198, 96-2222 (Kraft & Coffman, 2000c) 97-261, 97-2154 (Kraft & Coffman, 2000b), 97-563, 97-2170, 97-2162 (Kraft & Coffman, 2000a), qui cumulent toutes la résistance partielle à *A. euteiches*, à *Fusarium solani*, à *F. oxysporum* races 1 et 2, et pour certaines la résistance aux virus cités plus haut.

En 2000, son programme de sélection s'arrête également, suite à son départ en retraite. La généalogie de ses lignées est récapitulée sur la figure S.10.

L'originalité des travaux de J.M. Kraft par rapport à ceux de Davis et de Gritton réside :

- dans le choix des sources de résistance : il a incorporé dans ses schémas PI166159 et PI180693 de chez Lockwood, PI180693 lui servant de référence résistante,
- dans sa démarche d'accumulation de résistance aux différents agents de nécroses racinaires fongiques, et maladies virales,
- dans sa recherche de critères de quantification de résistance, commencés récemment et sur lesquels nous allons revenir.

2.2.1.1.5 Criblage de la banque de gènes de Pullman

De 1990 à 1994, 2514 génotypes d'origine géographique très diverse ont été criblés par DK Malvick dans le Minnesota, vis-a-vis d'une seule souche d'*A. euteiches* : 467 (Malvick & Percich, 1996).

Ce criblage s'est fait selon deux critères : sévérité de symptômes racinaires (Disease severity index = DSI), somme des pourcentages de perte de poids frais racinaire et aérien (mesurés séparément), en comparaison à un témoin sain (Disease rating = DR).

Les lignées les plus résistantes sont peu nombreuses, souvent de type sauvage.

Sur les 123 meilleures lignées (5% de la collection), 5 isolats d'*A. euteiches* (différant par leurs origines géographiques et leurs caractéristiques de virulence) ont été inoculés afin de distinguer les lignées ayant le meilleur niveau de résistance non-spécifique (Malvick & Percich, 1999).

Aucune lignée ne se montre plus résistante que MN313 et MN314, mais un certain nombre de génotypes affichent un bon niveau de résistance général, notamment PI 244162, PI 393487 , PI 210641, PI 210642, PI 411143, PI 413696.

2.2.1.2 Conclusion

Les sélectionneurs, jusque dans les années 1970, disposaient de peu de matériel résistant, de niveau assez bas (Papavizas & Ayers, 1974). Ils notaient la résistance selon un critère très global (mortalité).

Les chercheurs qui ont suivi (et ce dans les 4 équipes évoquées) ont ensuite sélectionné sur un faible niveau de symptôme d'une part, et de moindres pertes de biomasse et rendement d'autre part.

Les sources de résistance principales sont d'une part Mn494-A11, Mn108 chez Gritton et Davis, et d'autre part les lignées de Kraft (notamment 792022, 902131, 902079), ainsi que la lignée sauvage PI180693.

Le matériel le plus performant de Pullman, peu ou pas connu, n'est en fait pas encore incorporé dans des programmes de sélection.

2.2.2 Composantes de la résistance

On oppose généralement la résistance qualitative, qui évoque des relations hôte-parasite de type "tout ou rien" et un déterminisme génétique simple (gènes agissant à l'état isolé et souvent indépendamment les uns des autres (Rapilly, 1991)), à la résistance quantitative qui

s'oppose à une ou des parties du cycle infectieux du parasite, possède un déterminisme génétique complexe faisant intervenir de nombreux gènes mineurs non indépendants les uns des autres (Nelson, 1978; Young, 1996).

Malgré le manque de connaissances actuelles sur son déterminisme génétique, la résistance à *A. euteiches* est considérée comme quantitative, dès les travaux de Morrisson en 1971, avec comme composante principale la réduction du nombre d'oospores produites dans les racines. Shehata *et al.* (1983a) ont démontré depuis que cette résistance est héritée de façon polygénique.

Dans le pathosystème *A. euteiches*/pois, la résistance quantitative pourrait s'exprimer sur les phases pré-infectieuses de la maladie (germination des oospores, attraction et germination des zoospores) et/ou sur les phases post-infectieuses (vitesse de progression dans les tissus, quantité de champignon dans les racines, nombre d'oospores produites).

Lors d'essais menés dans des exsudats racinaires de génotypes résistant (MN313) et sensible (77 Early Perfection), aucune inhibition de germination d'oospores n'est observée. La résistance du génotype MN313 ne semble donc pas s'exprimer sur cette phase du cycle (Shang *et al.*, 2000b).

Les études les plus complètes de décomposition de la résistance ont été menées par l'équipe de JM Kraft. En se dotant de méthodes de mesure adéquates (Kraft & Boge, 1994; Kraft & Boge, 1996) (antisérum et test ELISA pour quantifier le mycélium du pathogène dans les racines, mesure de progression de lésion, de germination des zoospores dans les exsudats racinaires), cette équipe a montré que la résistance de PI180693 et des lignées 90-2131 et 79-2022 s'exprime au niveau de plusieurs composantes :

- une moindre germination de zoospores dans les exsudats racinaires ; cet effet serait partiellement expliqué par la présence d'anthocyanine dans les exsudats de PI180693, substance qui inhiberait par ailleurs la germination des conidies et chlamydospores de *Fusarium solani*.
 - une diminution de la multiplication du champignon dans les racines : progression de lésion moins rapide, moindre quantité de mycélium et oospores par unité de racine.
- Pour améliorer la résistance, Kraft suggère ainsi d'incorporer dans les schémas de sélection des génotypes à grosses racines.

En résumé, la résistance présente dans les lignées connues de pois est quantitative, et se manifesterait sur (exsudats) ou dans les racines, alors que le champignon est arrivé au contact de la plante et a commencé sa pénétration.

Cette résistance s'exprimerait donc sur les phases précédant juste l'infection, ainsi qu'en aval de la reconnaissance hôte-parasite, et jouerait sur le taux de multiplication et de reproduction du champignon.

Cette résistance ferait intervenir de la tolérance (à mêmes symptômes, rendement meilleur); elle aurait des composantes race-spécifique, signalées par la plupart des sélectionneurs (Davis & Shehata, 1989; Kraft *et al.*, 1998), mais non étudiées précisément.

2.2.3 Déterminisme de la résistance à *Aphanomyces euteiches*

Comme nous l'avons déjà indiqué, pour Marx *et al.* (1972), la résistance partielle à *A. euteiches* était liée à 3 allèles de type sauvage, sans qu'ils sachent si ces caractères étaient oligo ou polygéniques.

Au cours des années 1990, des essais de cartographie génétique par RAPD (Cargnoni & Weeden, 1994) ont été entrepris par l'équipe de N. Weeden (Université Cornell, Geneva) sur du matériel de Gritton, et sur Mn108 et Mn494-A11. Des marqueurs ont ainsi été mis en évidence, dont l'un est situé sur le groupe de linkage VI, très proche du gène de résistance à l'oïdium Er-1.

Deux équipes américaines (Norman Weeden et Clare Coyne) se sont orientées vers la détection de QTL (Quantitative Trait Loci) impliqués dans cette résistance.

Weeden a constitué des populations de 52 à 100 lignées recombinantes (RIL = recombinant inbred lines), à partir des croisements MN314 x Badger, MN313 x Sparkle et 90-2131 x Badger, afin de localiser et cartographier des loci de caractère quantitatif (QTL) codant pour la résistance à *A. euteiches*. Les tests de résistance ont été effectués par CR Grau en serre (avec l'isolat P54), ainsi qu'au champ ; les marqueurs moléculaires utilisés sont des RAPD et des SCARs, présents sur la carte génétique du pois (Weeden, communication personnelle 1998). Sur une population de 45 lignées recombinantes (RILs) dérivées du croisement MN313 x OSU1026 (sensible), une zone localisée a ainsi été détectée sur le groupe de liaison IV, significativement corrélée à la résistance partielle de MN313 exprimée au champ sur le site de LeSueur (Minnesota), mais pas sur le site de Pullman (Etat de Washington) (Weeden *et al.*,

2000). Pour expliquer cette situation, les auteurs avancent l'hypothèse de l'existence de populations d'*A.euteiches* différenciées entre les deux sites.

Sur une population de 127 RILs dérivées du croisement 90-2079 (résistant) x Puget (sensible), M.-L. Pilet-Nayel (INRA Rennes – Génétique et Amélioration des Plantes) et Clare Coyne (Washington State University, Pullman) ont détecté un QTL majeur, expliquant 39% de la variation de résistance, et corrélé à plusieurs critères de résistance (indice de dépérissement aérien, indice de nécrose racinaire, perte de poids sec par plante, pourcentage de perte de rendement) mesurés au champ sur 2 ans (1996 et 1998) et sur différents sites (LeSueur, MN, et Pullman, WA). La localisation de ce QTL majeur n'est pas encore clairement définie (Pilet-Nayel *et al.*, 2001).

2.3 L'interaction *A.euteiches* /pois

Aux Etats-Unis, de nombreux chercheurs ont constaté de grandes différences de comportement de lignées résistantes entre sites d'expérimentation (Davis & Shehata, 1989; Kraft *et al.*, 1998; Malvick & Percich, 1998a; Weeden *et al.*, 2000; E.T. Gritton, J.A. Percich, J.M. Kraft, communications personnelles 1998), suggérant l'existence de populations pathogènes différant par leur virulence sur pois. Cependant, les études de virulence sur pois ont toujours été limitées par le manque de cultivars résistants ou indemnes (Papavizas & Ayers, 1974).

Beute & Lockwood (1967), après les études préliminaires de King & Bissonnette (1954), ont été les premiers à formaliser la description des interactions *A. euteiches* / pois, par le choix d'une gamme différentielle à 6 génotypes, et en estimant la virulence d'après des cinétiques de mortalité de plantes. Deux "races" ont été ainsi définies (Tableau S.3).

Sundheim (1972), reprenant la même méthodologie mais en considérant le nombre de plantes mortes au 10^{ème} jour après inoculation (mais sans définir de seuil de virulence/avirulence précis), a mis en évidence 3 "races" supplémentaires. Cette gamme et cette méthodologie ont été sévèrement critiquées par Manning & Menzies (1984), qui ont montré notamment que l'application des deux critères de virulence utilisés précédemment sur des données identiques conduisait à des classifications contradictoires, et que les classements de souches-référence n'étaient pas reproductibles.

La dernière étude est celle de Malvick & Percich (1998a), basée sur une nouvelle gamme composée de 5 génotypes (Tableau S.3), qui distingue 2 groupes de virulence parmi 114 isolats américains.

Ces différentes études laissent ouvertes un certain nombre de questions.

Le déterminisme génétique de la relation *A. euteiches*/pois demeure inconnu, du fait notamment de la méconnaissance du fond génétique et de la généalogie des génotypes différentiels utilisés, qui sont tous d'un faible niveau de résistance (mis à part MN313 : Tableau S.3). Certains de ces hôtes différentiels présenteraient également de l'hétérogénéité génétique (jusqu'à 30% d'hétérozygotie) (C.R. Grau, communication personnelle 1998).

D'autre part, les critères de virulence choisis, notamment la fixation d'un seuil de non-pathogénicité arbitraire, demeurent sujets à discussion.

Enfin, aucune étude n'a été menée sur une collection représentative d'un pays entier, ou de plusieurs pays.

2.4 Variabilité pathogène et génétique dans les isolats-population d'A.euteiches

Chez les Oomycètes, la recombinaison sexuée et la variation somatique *via* la reproduction asexuée (zoospores) peuvent être deux sources de variation, les individus pouvant être des homocaryons ou des hétérocaryons. Des variations entre lignées monosporées ont été décrites sur *P.infestans* et *Phytophthora sojae* (Leach & Rich, 1969; Caten, 1971; Rutherford *et al.*, 1985).

Sur *A.euteiches*, Holub *et al.* (1991) ont comparé les caractéristiques de pathogénicité de lignées monosporées issues d'un isolat-population. Ils ont ainsi observé que les monospores-filles étaient moins agressives que l'isolat d'origine.

Malvick *et al.* (1998) ont voulu étudier plus finement les variations d' *A.euteiches* s'exprimant parmi les zoospores. Dix-huit lignées monosporées issues de trois isolats-population différents, mais eux-mêmes déjà monosporés, ont été inoculées sur pois, haricot et luzerne, et analysées par RAPD. Dans cette étude, aucun isolat monosporé n'a donné un indice de nécrose (IN) supérieur à sa lignée parentale, mais certains sont significativement moins agressifs que celle-ci. Un faible polymorphisme RAPD a été observé chez deux descendance monosporées sur trois.

L'étude la plus complète chez *A.euteiches* est sans doute celle de Shang *et al.* (2000c), dont l'objectif était de "déterminer si les propagations asexuées ou sexuées autogames peuvent générer autant de variabilité que celle observée parmi des isolats provenant du champ". A partir de quatre isolats du champ (deux de pathotype "pois" et deux de pathotype "haricot"), cette équipe a donc produit plusieurs générations successives de monozoospores et monooospores, puis évalué leur spécificité pathogène (sur pois et haricot), leur croissance linéaire, la taille de leur zone aplérotique, et leur profil RAPD. Elle a ainsi démontré que ces différentes générations ne différaient ni entre elles, ni de leur souche parentale, et ce pour chacun des critères estimés. Les différences observées entre isolats-population se retrouvent par ailleurs dans leurs descendance.

D'après ces différents travaux, la variabilité pathogène et moléculaire existant à l'intérieur d'un isolat-population serait mineure ; les isolats-population seraient donc des homocaryons.

3 STRUCTURATION DES POPULATIONS : QUEL STATUT POUR *A.EUTEICHES* PARMI LES CHAMPIGNONS PHYTOPATHOGENES D'ORIGINE TELLURIQUE

La connaissance de la biologie et de la structuration des populations pathogènes est particulièrement importante pour la compréhension des épidémies. Elle permet d'une part d'approcher les raisons du développement de la maladie : l'agent pathogène a-t-il été introduit accidentellement, ou était-il endémique, présent à l'état latent ? Pei *et al.* (2000) ont ainsi montré que les nouveaux cas de rouille observés sur Saule étaient dus à plusieurs sources d'inoculum. Cette connaissance permet ensuite de définir quelles sont les barrières d'espèces ou géographiques qui structurent la population pathogène, de voir quelles sont les stratégies de lutte qui peuvent affecter cette structure; elle permet enfin d'estimer le potentiel d'évolution de cette population (McDonald, 1997), notamment par la connaissance du mode de reproduction de l'agent pathogène, et d'anticiper éventuellement sur cette évolution.

La seule étude connue concernant la biologie et la structuration des populations d'*A.euteiches* a été menée par Malvick & Percich (1998a) sur 114 isolats, prélevés sur 4 sites du Centre-Ouest des Etats-Unis (deux dans le Minnesota, un dans le Wisconsin, un dans l'Oregon), correspondant à des pépinières infestées.

La structuration de la diversité ainsi mise en évidence par RAPD et caractérisation biologique est contrastée (Figure S.11).

La diversité génotypique est très forte (chaque isolat est un génotype unique). Cependant, la majorité des isolats (102) partagent plus de 92% de similarité génotypique, sont de même phénotype de virulence (avirulents sur MN313 et MN314, deux lignées de pois), et se répartissent sur les 4 sites échantillonnés, ce qui tend à montrer qu'il n'y a pas de structuration géographique nette des populations d' *A. euteiches* d'après les marqueurs utilisés. Les estimations de structuration de la diversité génétique font de plus apparaître que la diversité est surtout présente dans les parcelles et très peu entre parcelles.

Par ailleurs, un groupe mineur d'isolats, génotypiquement plus éloigné et virulent sur MN313 et MN314, ne se retrouve que sur les 2 sites du Minnesota, et plus précisément sur une zone

restreinte de leurs parcelles d'origine. D'après ces résultats, plusieurs populations de virulences différentes pourraient donc coexister dans un même champ.

Les connaissances sur *A.euteiches* dans ce domaine pourtant important sont donc très faibles : de nombreuses zones d'ombre demeurent sur un certain nombre d'étapes de son cycle, sur la structuration de ses populations par rapport à sa spécificité d'hôte en conditions naturelles. L'examen, sur ces bases, des données acquises sur quelques champignons telluriques plus ou moins proches d' *A.euteiches*, nous a semblé de nature à nous aider à formuler des hypothèses de travail sur notre modèle.

Dans le monde des champignons phytopathogènes, les champignons du sol constituent un groupe particulier.

Ils sont d'abord caractérisés par une moindre possibilité de dissémination directe, notamment par le vent, en comparaison avec les parasites aériens. Il devrait théoriquement en résulter moins d'intercroisements et d'échanges à longue distance, et donc plus de structuration interpopulations, entre bassins de production notamment (par dérive génétique ou par adaptation au milieu (type de sol, climat)).

Leur deuxième singularité tient au milieu extrêmement complexe dans lequel ces champignons évoluent. Le potentiel infectieux d' un sol est en effet défini par Lockwood (1988) comme la résultante de 4 composantes : la densité d'inoculum, l'énergie endogène (taille des spores) et exogène (action des exsudats racinaires sur l'activité des propagules) par unité de propagule, la virulence génétique des propagules, et l'environnement biotique et abiotique (que l'on peut assimiler à la réceptivité des sols).

Dans le sol, deux groupes écologiques de champignons ont été différenciés par Garrett (Lockwood, 1988) : les "envahisseurs" et les "habitants".

Les "envahisseurs" sont des microorganismes qui séjournent dans le sol de façon transitoire, entrent dans le sol par hasard et ne peuvent s'y maintenir en condition active. On trouve de nombreux exemples de ce groupe chez les agents pathogènes aériens dont une partie du cycle (hibernation notamment) se fait dans le sol, sur des débris de culture : *Phytophthora infestans* (mildiou de la pomme de terre et tomate) (Lebreton, 1998); *Leptosphaeria maculans* (nécrose du collet du colza) (Pilet, 1999), *Mycosphaerella pinodes* (anthracnose du pois) (Tivoli *et al.*, 1996).

Les "habitants" sont quant à eux inféodés au sol, mais peuvent avoir des comportements écologiques diversifiés. Un certain nombre d'entre eux (tels que les *Pythium spp.*) se multiplient activement en présence d'une source nutritive disponible et adaptée, puis reviennent à un état quiescent, tandis que d'autres (tels que les *Rhizoctonia spp.*) présentent un développement moins rapide mais constant, souvent sur des substrats inertes, organiques ou minéraux.

Les agents pathogènes du groupe des "habitants" sont souvent considérés comme primitifs et peu spécialisés, attaquant préférentiellement les jeunes plants et les tissus racinaires juvéniles; parallèlement à leur capacité parasitaire, ils sont dotés d'une phase saprophytique plus ou moins active. Dans ce groupe se trouvent typiquement les agents de fonte de semis, tels que *Pythium spp.* et *Rhizoctonia spp.*

Les véritables parasites racinaires, qui se manifestent à un stade de développement de la plante plus avancé, sont souvent plus spécialisés que les précédents, avec un effet destructeur moins immédiat (Lockwood, 1988). Cette spécificité renferme en fait deux niveaux : (1) elle peut être liée à une famille botanique particulière, comme c'est le cas pour *Plasmodiophora brassicae*, champignon responsable de la Hernie des Crucifères; (2) elle peut être beaucoup plus étroite, avec la subdivision d'espèces en souches spécialisées à une espèce-hôte, peut-être en réponse aux pratiques culturales : dans ce groupe se trouvent l'espèce *Fusarium oxysporum*, qui se subdivise en formes spéciales (spécifiques d'espèces hôtes) et races (spécifiques de variétés d'une même espèce hôte), ainsi qu'un certain nombre de champignons à zoospores, parmi lesquels le complexe d'espèces *Phytophthora megasperma* (Deacon, 1996).

Nous avons choisi d'aborder trois types de champignons phytopathogènes telluriques, dont chacun a des caractéristiques spécifiques du point de vue de son écologie, de la relation entre sa spécialisation parasitaire et sa structure de populations, et de sa réponse évolutive aux pratiques agricoles :

- un champignon primitif, complexe d'espèces dont la polyphagie est variable, possédant une capacité saprophytique importante et une reproduction asexuée prédominante : *Rhizoctonia solani*,
- un agent de trachéomycose très spécialisé, divisé en sous-groupes dont la spécificité d'hôte est elle très étroite, à capacité saprophytique réduite : *Fusarium oxysporum*
- un oomycète dont le cycle biologique se rapproche de celui d'*A. euteiches*, et qui renferme des sous-espèces très spécialisées et d'autres polyphages : *Phytophthora megasperma*.

3.1 *Rhizoctonia solani* Kuhn

Rhizoctonia solani est la forme asexuée (ou anamorphe) du basidiomycète filamenteux *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk. Chez cette espèce coexistent un pouvoir saprophytique important et une pathogénicité relativement peu spécialisée.

On considère actuellement que *R. solani* est en fait un complexe d'espèces composé de souches distinctes génétiquement, d'histoires évolutives très différentes, et pouvant provoquer une grande diversité de symptômes sur plante. L'isolement génétique des différentes populations dans l'espèce *R. solani* est matérialisée par les "groupes d'anastomoses" (anastomosis group ou AG): lorsque deux thalles fusionnent leurs hyphes, il n'y a formation d'un hétérocaryon viable que si les deux partenaires sont compatibles végétativement.

L'incompatibilité se caractérise par la vacuolisation et mort rapide des cinq à six cellules adjacentes à la zone de fusion. Actuellement ont été caractérisées 12 AG (Cubeta & Vilgalys, 1997), dont cinq ont été subdivisés en sous-groupes qui diffèrent morphologiquement, par leurs caractères de pathogénicité et leurs empreintes génétiques (Rosewich *et al.*, 1999). Le Tableau S.4 résume les relations de compatibilité végétative entre AG. Ces AG sont bien différenciés par les séquences d'ADNr, montrant que ces différents groupes sont des entités évolutives distinctes (Vilgalys & Gonzalez, 1990).

Les différents AG ne sont généralement pas spécialisés sur une espèce particulière ; certains ont cependant des caractéristiques infectieuses relativement définies (Agrios, 1988), provoquant des pourritures de semence et d'hypocotyle sur de nombreuses espèces (AG1), ou chancres (AG2 sur les cultures à racines tubéreuses). D'autres, telles que les AG4, sont très polyphages et provoquent une grande variété de symptômes (fonte de semis sur presque toutes les angiospermes, lésions sur tige sur les Légumineuses, coton et betterave).

Les AG diffèrent aussi par leur mode de reproduction: deux (AG1 et AG4) sont hétérothalliques bipolaires tandis que l'AG8, bien qu'hétérothallique, a une structure de population de type homothallique (Tableau S.4). Dans la nature cependant, le stade asexué semble prédominant dans le cycle du champignon, bien que la phase sexuée soit observée (particulièrement pour les AG 1 à 5). Pour la majorité des AG, les épidémies sont déclenchées par des propagules asexuées (sclérotés ou mycélium, souvent associés aux débris de culture), capables de survivre plusieurs années dans le sol. La maladie se développe ensuite par foyers. Bien que les basidiospores ne semblent pas d'une importance épidémiologique significative à l'échelle d'une saison, elles pourraient jouer un grand rôle dans la génération de diversité génétique.

Des travaux récents réalisés dans différentes zones de rizières du Texas, montrent que les populations de *R.solani* présentes (AG1 IA) ne sont pas structurées entre elles, évoquant un fort flux de gènes entre parcelles. Tous les isolats d'une même zone malade ont le même génotype, suggérant une dissémination clonale à l'échelle parcellaire; la mise en évidence de génotypes identiques à plusieurs centaines de km de distance suggère d'autre part une dispersion à longue distance de structures asexuées (sclérotas ou mycélium). Il y aurait donc conjonction d'une faible dispersion pendant la saison, et d'un mécanisme assurant la dispersion lointaine de matériel clonal, apparemment sans intervention directe de l'homme dans ce cas, mais peut-être par les oiseaux ou les semences (Rosewich *et al.*, 1999).

Les études de biologie des populations n'en sont cependant qu'à leur début sur *R.solani*, notamment pour répondre à certaines questions fondamentales sur la nature génétique des individus dans une population (homocaryons ou hétérocaryons ?), sur la fréquence des recombinaisons croisées (allogamie), sur l'importance de la reproduction clonale, sur l'établissement et le maintien des populations (Cubeta & Vilgalys, 1997). L'évolution des populations en réponse à la pression culturale n'est pas non plus connue.

Sur cette espèce, le facteur majeur de structuration n'est pas la spécialisation pathogène, mais plutôt le mode de reproduction et la compatibilité végétative, ainsi que la capacité à provoquer une maladie ou non (Banniza *et al.*, 1999).

3.2 *Fusarium oxysporum* Schlecht.

F.oxysporum est un champignon très commun dans le sol. Ce groupe est particulièrement important économiquement, car nombre de ses membres sont des agents de flétrissement vasculaire (ou fusarioses vasculaires) et plus rarement de nécroses racinaires sur une grande diversité d'espèces agricoles et ornementales. A côté des souches de *F. oxysporum* pathogènes capables d'envahir le cortex et le xylème des plantes, existe dans le sol tout un cortège de souches non-pathogènes, parfois capables de coloniser les racines, et douées d'un faible pouvoir saprophytique (Woo *et al.*, 1998).

Cette espèce est divisée en sous-groupes morphologiquement similaires, mais de spécificité d'hôte très étroite : les formes spéciales. Plus de 120 formes spéciales ont été décrites (Woo *et al.*, 1998) qui dénotent une très forte spécialisation à l'hôte, même si certaines ont une gamme d'hôte un peu plus étendue (telle la f.sp. *radicis-lycopersici*, qui attaque la tomate mais aussi d'autres familles botaniques (Kistler, 1997)). Les formes spéciales associées aux nécroses racinaires ont été souvent considérées comme moins spécialisées et distinctes phylogénétiquement des formes spéciales colonisant le système vasculaire.

Ces formes spéciales ont été considérées comme monophylétiques, mais des travaux récents de phylogénie moléculaire montrent que certaines souches d'une même forme spéciale sont génétiquement plus éloignées entre elles que de souches non-pathogènes (Kistler, 1997), et que certaines formes spéciales ont une origine polyphylétique (Baayen *et al.*, 2000).

A l'intérieur de certaines formes spéciales a également été signalée une subdivision supplémentaire : les races physiologiques, correspondant à une spécificité au niveau du cultivar, et correspondant à une relation de type gène-pour-gène (par exemple, les races 1 et 2 de *F.oxysporum* f.sp.*lycopersici* correspondent respectivement aux gènes de résistance I et I-2 de la tomate (Kistler, 1997)).

F.oxysporum est complètement dépourvu de sexualité. Des phénomènes de parasexualité existent cependant : des groupes de compatibilité végétative (VCG), déterminés par la formation réussie d'un hétérocaryon, ont été mis en évidence. Les populations de *F.oxysporum* semblent constituées de lignées clonales, correspondant à des VCG distincts. Très souvent, les groupes moléculaires (haplotypes mitochondriaux ou nucléaires) correspondent bien aux VCG détectés dans chaque forme spéciale mais pas aux races, sauf dans quelques cas, par exemple chez *F. oxysporum* f.sp. *pisi* (Woo *et al.*, 1998).

A l'heure actuelle, on ne sait pas comment *F. oxysporum* génère de la diversité génétique. De la parasexualité a ainsi été observée au laboratoire, mais on ne connaît pas l'occurrence de ce phénomène dans la nature. Les éléments transposables, qui constituent jusqu'à 5 % de son génome, pourraient avoir un profond impact sur la structure et la fonction des gènes (Daboussi, 1997), ainsi que sur l'arrangement de tout le génome (Kistler, 1997; Woo *et al.*, 1998).

On considère que les formes spéciales constituent des entités génétiques « étanches », faisant d'ailleurs évoluer l'espèce *F. oxysporum* vers un complexe d'espèces. L'espèce-hôte apparaît clairement comme le facteur majeur de structuration. Mais l'effet des cultures hôtes sur le profil des isolats tirés du champ, ainsi que sur l'évolution des populations de ce champignon, n'a pas encore été bien étudié (Kistler, 1997).

3.3 Le complexe d'espèces *Phytophthora megasperma*

P.megasperma Drechs. (Pm) est une espèce qui provoque des pourritures racinaires, sur crucifères, carotte, pomme de terre, épinard, betterave, rose trémière, ainsi que sur de nombreux arbres fruitiers (Agrios, 1988), et des légumineuses telles que le soja, la luzerne et

le trèfle. Son cycle infectieux est caractérisé par une phase biotrophe transitoire (exploitation nutritive des tissus vivants de l'hôte) (Deacon, 1996), et dépourvu de phase saprophytique. Cet Oomycète tellurique, homothallique, est en fait une espèce hétérogène du point de vue de la gamme d'hôtes, mais aussi morphologiquement (aspect du mycélium, taille des oogones), physiologiquement et biochimiquement (Förster *et al.*, 1989). Des formes spéciales ont été ainsi dénotées sur soja (Pm f.sp. *glycinea*), luzerne (Pm f.sp. *medicaginis*), et trèfle (Pm f.sp. *trifolii*).

Suite aux nombreux travaux de caractérisation, Hansen (1987) a établi que *P.megasperma* était en fait constitué de 9 sous-groupes, répartis dans 2 grandes lignées évolutives (Figure S.12): (i) une lignée "Légumineuses" attaquant la luzerne, le soja, le trèfle, et le sapin de Douglas, dont les interactions avec l'hôte sont de type gène-pour-gène ; (ii) une lignée polyphage avec des isolats d'arbres fruitiers de la famille des Rosacées et d'autres hôtes, dont les interactions avec l'hôte sont de type généralisé et opportuniste.

Cette dichotomie a été confirmée plus tard par les travaux de Förster *et al.* (1989) en RFLP. Ces auteurs tendent à considérer les formes spéciales *glycinae* et *medicaginis* comme des espèces biologiques différentes, distinctes des isolats à "large gamme d'hôtes" (BHR). Les sous-groupes pathogènes de légumineuses ont été finalement élevés au rang d'espèces, d'après leurs caractéristiques morphologiques et pathogènes, ainsi que leur profils isoenzymatiques, nombre de chromosomes et marqueurs RFLP : *Phytophthora sojae* est spécifique du soja uniquement ; *P.medicaginis* rassemble les isolats à petites oogones, et pathogènes de la luzerne et le pois chiche ; *P. trifolii* rassemble les isolats infectant le trèfle (Hansen & Maxwell, 1991). Dans la nouvelle espèce *P.megasperma*, ont été distingués des groupes moléculaires spécifiques (Förster & Coffey, 1993): les souches pathogènes de l'asperge, les souches pathogènes du Sapin de Douglas (nommés DF par Hansen *et al.* (1986)), les souches pathogènes du cerisier et pommier (nommé AC par Hansen *et al.* (1986)).

Dans l'espèce *P.sojae* ont été caractérisées 39 races physiologiques, déterminées d'après la spécificité de virulence sur 13 gènes de résistance présents chez des génotypes de *Glycine max* (Schmitthenner, 2000). Ces races se seraient différenciées par évolution de lignées clonales, avec de rares recombinaisons croisées (Förster *et al.*, 1994).

Alors que les polyphages ont la capacité de s'intercroiser, les souches plus spécialisées ont un mode de reproduction fortement homothallique, avec l'existence de fortes barrières d'incompatibilité entre groupes: souches "luzerne" et souches "soja", souches "Douglas" et les autres (Hansen, 1987). Leur structure de populations n'a cependant pas fait l'objet d'étude spécifique.

Des isolats polyphages (BHR) et des isolats "luzerne" (ALF) ont été mis en évidence dans une même luzernière, au Japon et dans plusieurs Etats des Etats-Unis et du Canada; de même, des isolats polyphages et des isolats spécifiques du sapin de Douglas (DF) coexistent dans certaines sapinières de l'Oregon (Hansen, 1987). Selon Hansen (1987), il y aurait donc eu spéciation sympatrique des différents sous-groupes, à partir d'un *Phytophthora megasperma* endémique aux Etats-Unis, probablement non-spécialisé. Cette spéciation aurait été accentuée par les pratiques agricoles qui favorisent l'isolement reproducteur: sélection de souches spécialisées par les monocultures, isolement par le transport à longue distance de petits nombres d'individus qui évoluent rapidement sous l'effet de nouvelles pressions sélectives (nouveaux hôtes, par exemple).

3.4 Conclusion – quel est le statut d'*A.euteiches*

Ces trois modèles ont leur spécificité propre, et les moyens de lutte développés contre les maladies tiennent compte de ces spécificités. Les maladies causées par *Rhizoctonia solani* sont combattues essentiellement par la lutte chimique, le raisonnement des rotations, très peu par la lutte variétale (Agrios, 1988; Messiaen *et al.*, 1991). *Fusarium oxysporum*, dont le pouvoir saprophytique est bien moindre, mais dont le facteur de structuration majeur est l'hôte, est contrôlé par des variétés résistantes (4 gènes de résistance sont disponibles chez le melon, 2 chez la tomate). Le cas de *Phytophthora megasperma* est en fait intermédiaire : spéciation stricte par l'hôte chez *P. sojae* et *P. medicaginis*, contre lesquels ont été développées des variétés résistantes, en appui avec la lutte chimique ; spécificité d'hôte peu marquée chez les souches polyphages (BHR).

A.euteiches semble être plus proche du modèle *P. megasperma* : il est hémibiotrophe, sans phase saprophytique dans le sol. Sa spécialisation pathogène est limitée à une famille, les Légumineuses, avec des sous-populations semblant se spécialiser sur certaines cultures aux Etats-Unis (luzerne, haricot). *A.euteiches* se différencie cependant de *P.megasperma* par la bien moindre spéciation des sous-populations, toutes très proches morphologiquement, avec des différences moléculaires peu marquées.

Ces différents modèles renvoient également à de nombreuses questions sur *A.euteiches* : les populations issues de pois sont-elles un sous-groupe homogène, ou sont-elles la "forme ancestrale" dont se différencient peu à peu les souches "luzerne" et "haricot" ? Quelle est le degré de spécialisation de ces souches "pois", les seules observées jusqu'ici en France, sur

l'espèce *Pisum sativum*, mais également à l'intérieur de l'espèce ? Y a-t-il coexistence dans une même parcelle de souches spécialisées et souches polyphages ? Comment les populations d' *A.euteiches* sont-elles structurées, selon l'origine géographique et selon l'hôte ?

Ces questions montrent la nécessité de connaître la spécificité d'hôte des populations françaises, mais également le rôle joué par cette spécificité d'hôte (ou spécialisation pathogène) dans la structuration des populations. Sont-ce les rotations culturales, ou d'autres conditions environnementales qui structurent la diversité génétique des populations d'*A.euteiches* ?

4 INTERET DES MARQUEURS MOLECULAIRES DANS LES ETUDES DE DIVERSITE DES POPULATIONS

Chaque espèce d'agent pathogène se présente au champ comme une population d'individus entre lesquels la variabilité génétique existe presque toujours. Ces individus varient également en terme d'agressivité, de spécificité d'hôte, de virulence sur une même espèce végétale, d'adaptation à certains facteurs biotiques et abiotiques tels que la température, ou encore en terme de résistance aux pesticides.

Ces différents types de variabilité sont depuis longtemps caractérisés sur la base de critères biologiques. La mise en œuvre de nombreux tests plus ou moins complexes a permis des avancées significatives aussi bien dans le domaine de l'épidémiologie que dans la mise en place ou l'amélioration de méthodes de lutte génétique ou chimique. En dehors des contraintes d'application de ces tests, l'une des limites de ce type de caractérisation est que les données ainsi établies résultent de la combinaison de caractéristiques intrinsèques des individus, et de facteurs externes qui peuvent influencer grandement l'expression du potentiel génétique de l'individu.

Les marqueurs moléculaires, basés sur la variabilité des séquences nucléotidiques de l'ADN, ont pour intérêt de ne refléter que la part de variabilité intrinsèque à l'organisme. Ils sont donc particulièrement utiles pour contribuer à l'élucidation d'un certain nombre de questions agronomiques, souvent d'ailleurs en parallèle avec les outils biologiques, biochimiques, sérologiques, dans un certain nombre de thématiques :

- amélioration du diagnostic phytosanitaire, pour déterminer si une ou plusieurs espèces d'agents pathogènes, morphologiquement semblables, sont impliquées dans une maladie donnée,
- étude de la durabilité de résistance et de l'efficacité de certains fongicides, par la connaissance du potentiel d'adaptation de la population pathogène,
- connaissance des mécanismes de structuration des populations (la migration de l'inoculum cause-t-elle une différenciation géographique des populations ?),
- épidémiologie (quelle est la part des formes sexuée ou asexuée dans l'établissement de l'épidémie sur une culture ?).

Certaines de ces questions relèvent de la caractérisation, ou typage pur, tandis que d'autres relèvent plus de la biologie et génétique des populations. Le choix des marqueurs doit être bien adapté à la question que l'on veut résoudre.

Il nous a donc paru intéressant dans cette partie, de rappeler les grands types de marqueurs moléculaires existants, et leurs champs d'application respectifs. Nous avons ensuite focalisé notre exposé sur l'analyse de la variabilité génétique des populations par empreintes génétiques, et plus particulièrement par la technique AFLP.

4.1 Grands types de marqueurs- Principe

Les marqueurs moléculaires peuvent être classés en deux catégories majeures (de Vienne, 1998) : les marqueurs codominants et révélés individuellement, et les marqueurs dominants et révélés en masse ("empreintes génétiques") (Tableau S.5).

4.1.1 Marqueurs codominants révélés individuellement

Ces marqueurs permettent d'aborder deux types de polymorphisme :

4.1.1.1 le polymorphisme de séquence

Il est le plus souvent estimé par des méthodes indirectes, plus rapides que le séquençage, basées sur la détection de différences de sites de restriction, de conformation ou d'hybridation d'amorces.

- On trouve dans cette catégorie la technique de "polymorphisme de longueur des fragments de restriction" (Restriction Fragment Length Polymorphism, ou RFLP), qui consiste à digérer l'ADN génomique par des enzymes de restriction reconnaissant des sites de coupure spécifiques, puis à hybrider une sonde (petit fragment d'ADN) qui va reconnaître un endroit (ou locus) particulier sur le génome. Cette technique peut cependant être aussi utilisée pour faire des "empreintes génétiques", par utilisation d'une sonde répétée-dispersée (par exemple, sonde RG57 chez *Phytophthora infestans* (Goodwin, 1997)).
- La technique de "digestion de produit d'amplification" (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, ou CAPS), appelée également PCR-RFLP, est dérivée des RFLP. Dans ce cas, on amplifie une région du génome donnée (souvent un gène) par PCR avec des amorces spécifiques, et le polymorphisme de séquence dans cette région est estimé par digestion enzymatique et migration sur gel d'agarose. L'un des exemples les plus connus sur les champignons est l'étude de la région des espaces

internes transcrits (ITS) dans la zone codant pour l'ARN ribosomique : cette région, très conservée au niveau intraspécifique, permet de différencier différentes espèces d'un même genre, et a servi de base à plusieurs études de taxonomie moléculaire (Mugnier, 1998; Leclerc *et al.*, 2000)

- La technique de "polymorphisme de conformation simple brin" (Single Strand Conformation Polymorphism, ou SSCP) révèle le polymorphisme de séquence par les différences de conformation. Lorsqu'un fragment d'ADN double brin est dénaturé par chauffage à 95°C, puis rapidement refroidi, les molécules simple brin n'ont pas le temps de se réappairer, mais forment une structure secondaire stable par des réassociations au niveau de zones complémentaires. Les différences de séquence peuvent entraîner des différences de conformation qui sont détectées par une migration en conditions non dénaturantes sur gel d'acrylamide. La technique de PCR-SSCP relève du même principe que les CAPS : on révèle le polymorphisme de séquence d'une région génomique, préalablement amplifiée par PCR, mais cette fois par ses différences de conformation (de Vienne & Santoni, 1998).

4.1.1.2 *Le polymorphisme de nombre d'unités de répétition*

- Les microsatellites, ou SSR (simple sequence repeats) sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques (par exemple (TC)_n, (TAT)_n, etc..). Ces motifs sont très abondants chez les Eucaryotes, répartis sur tout le génome, et d'un polymorphisme extrêmement élevé. Chaque locus microsatellite va être révélé individuellement, par amplification PCR grâce à des amorces flanquantes ; le polymorphisme de longueur de ce locus sera révélé par migration sur gel d'acrylamide.

Ces marqueurs spécifiques de locus, codominants et hautement polymorphes sont des outils de choix en génétique des populations, mais aussi en cartographie génétique. Très utilisés chez les animaux et les végétaux supérieurs, ils sont moins fréquemment cités chez les champignons. Leur mise en œuvre reste très lourde : il faut cribler une banque génomique avec une sonde du microsatellite, séquencer les clones positifs, synthétiser les amorces et tester les paires d'amorces sur un échantillon d'individus pour estimer leur polymorphisme.

4.1.2 **Les marqueurs révélés en masse ("empreintes génétiques")**

Contrairement aux marqueurs décrits précédemment, les techniques abordées ici permettent de révéler en même temps plusieurs loci sur tout le génome, et donc de caractériser un

génotype. Sur cette partie, nous nous limiterons à deux techniques : la RAPD et l'AFLP, qui révèlent toutes deux du polymorphisme de séquence.

4.1.2.1 Différences de sites d'hybridation d'une amorce arbitraire

Les techniques de “profils d'amplification arbitraires multiples” (Multiple Arbitrary Amplicon Profiling ou MAAP) ont pour principe d'amplifier des régions du génome d'un individu donné avec une amorce de séquence arbitraire. Parmi ces techniques, celle d' “ADN polymorphe amplifié au hasard” (Random Amplified Polymorphic DNA, ou RAPD) utilise des amorces de 9 à 10 bases. Cette méthode est très populaire en biologie végétale et en pathologie végétale, de par sa simplicité et sa rapidité de mise au point. Son inconvénient majeur reste le relatif manque de reproductibilité des résultats et les difficultés de transfert de technique entre laboratoires.

4.1.2.2 Différences de sites de restriction et de sites d'hybridation d'une amorce arbitraire

La technique de “polymorphisme de longueur des fragments amplifiés” (Amplified Fragment Length Polymorphism, ou AFLP (Vos *et al.*, 1995)) est fondée sur la mise en évidence de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorce arbitraire. L'ADN est d'abord digéré par deux enzymes de restriction (l'une coupant souvent, comme *MseI*, et l'autre coupant rarement, comme *EcoRI*), puis les bouts cohésifs sont ligués à des adaptateurs *EcoRI* et *MseI*, de séquence connue, qui ajoutent 20 bases de part et d'autre des fragments. Une première amplification, dite non sélective, avec des amorces (homologues des adaptateurs) prolongées en 3' d'une base arbitraire, ne va amplifier qu'un sous-ensemble des fragments *EcoRI-MseI* (les fragments *MseI-MseI* et *EcoRI-EcoRI* ne seront pas amplifiés). Les fragments amplifiés vont ensuite subir une deuxième amplification, dite sélective, avec des amorces homologues des adaptateurs et prolongées en 3' de deux, trois ou plusieurs bases arbitraires. Cette technique révèle un nombre élevé de bandes polymorphes, qui sont le plus souvent bien réparties sur l'ensemble du génome. Elle est de plus en plus utilisée en biologie végétale, mais aussi chez les champignons, comme technique d'empreintes génétiques.

4.2 Quels marqueurs ? Pour quoi faire ?

Le tableau S.6 résume les caractéristiques des principaux types de marqueurs, et le tableau S.7 donne un aperçu de leurs champs d'application en analyse génétique des champignons.

Pour choisir la technique la plus appropriée, il faut savoir quel est le niveau de polymorphisme requis pour répondre le mieux possible à la question posée, connaître les

approches analytiques ou statistiques disponibles, ainsi que le temps et le coût matériel requis par ces techniques (Wang & Szmidt, 2000).

Les marqueurs de PCR-RFLP (CAPS) ou PCR-SSCP sont surtout utilisés sur des régions génomiques connues, comme par exemple la région des gènes codant pour l'ARNr (espaces internes transcrits (ITS), 5.8S, 18S ou 28S). Les régions 18S et 28S sont très conservées dans l'évolution, et ont d'ailleurs servi à comparer des organismes distants, de différents genres, familles ou même règnes (voir par exemple la synthèse de Mugnier (1998)). Les ITS, plus variables, permettent de comparer plusieurs espèces d'un même genre, et d'en déduire des amorces PCR spécifiques d'espèce, de genre ou de famille (Wang & Szmidt, 2000). Ces outils sont d'une grande utilité en étiologie, par exemple pour caractériser des sous-groupes de *Rhizoctonia solani* associés au dépérissement du maïs (Pascual *et al.*, 2000) et du riz (Matsumoto *et al.*, 1996), ou pour éclaircir les relations taxonomiques entre espèces de morille (Buscot *et al.*, 1996), mais également en détection et identification (Moricca & Ragazzi, 1998; Zhang *et al.*, 1999). Leur faible variabilité au niveau intraspécifique rend cependant leur usage peu adéquat à la comparaison de populations d'une même espèce.

Les marqueurs codominants spécifiques de locus (RFLP, microsatellites) sont très adaptés aux études de génétique des populations, où il faut avoir accès aux allèles de chaque locus. Ils demandent néanmoins un fort investissement initial de mise au point, pour cribler des loci éventuellement polymorphes. La RFLP nécessite également l'isolement de grosses quantités d'ADN.

Les empreintes génétiques peuvent être mises en œuvre sans connaissance préalable du génome de l'organisme, et nécessitent peu d'ADN grâce à l'utilisation de la PCR (Tableau S.6). Répartis sur l'ensemble du génome, ils semblent plus propices à l'identification de génotypes différents à l'échelon intraspécifique.

4.3 Empreintes génétiques : RAPD ou AFLP ?

La technique RAPD a été la plus utilisée dans les études de caractérisation et de diversité des populations, alors que l'AFLP, du fait de sa relative nouveauté et haute technicité, a été moins employée.

Plusieurs études ont comparé les deux types de marqueurs. Selon Arenal *et al.* (1999), les deux techniques ont la même résolution sur *Epicoccum nigrum*. Sur *Colletotrichum lindemuthianum* en revanche, la technique AFLP s'est montrée beaucoup plus résolutive :

alors que 10 amorces RAPD donnent un total de 62 bandes, quatre combinaisons d'amorces AFLP en génèrent pratiquement 4 fois plus (230) (Gonzalez *et al.*, 1998). Ce plus grand nombre de bandes, et donc de loci, permet d'assurer une analyse statistique plus robuste, donnant une idée plus fidèle de la structure de population. Le même constat a été fait sur la caractérisation de populations de *Septoria tritici* d'Allemagne du Nord : les AFLP donnaient une moyenne de 36.3 fragments par combinaison, contre 6.3 fragments par amorce RAPD, avec une reproductibilité bien supérieure (Schnieder *et al.*, 1998). Des études faites sur bactéries (Clerc *et al.*, 1998) et sur nématodes (Folkertsma *et al.*, 1996) démontrent également la supériorité résolutive des AFLP sur les RAPD.

4.4 Utilisation de la technique AFLP

L'AFLP a été utilisée aussi bien en génotypage et caractérisation, qu'en étude de génétique de populations.

4.4.1 Génotypage de souches

En systématique et caractérisation, cette technique a ainsi permis d'identifier de nouveaux pathogènes lors d'enquêtes épidémiologiques en hôpital (Mueller & Wolfenbarger, 1999), par exemple pour savoir si les échecs de traitement contre *Helicobacter pylori* (agent causal de l'ulcère de l'estomac) étaient dus à une acquisition de résistance aux antibiotiques ou à l'introduction de nouvelles souches (Gibson *et al.*, 1998), ou encore pour discriminer des souches plus ou moins virulentes de *Listeria* (Aarts *et al.*, 1999). Elle s'est révélée beaucoup plus puissante que les méthodes classiques pour distinguer certaines espèces de nématodes du genre *Meloïdogyne* (Semblat *et al.*, 1998), de biotypes de *Phytophthora fragariae* (Bonants *et al.*, 1997), de pathotypes de la rouille jaune du blé (Justesen & Hovmoller, 1999). L'AFLP est cependant beaucoup plus adéquate à la discrimination entre espèces proches qu'entre organismes plus éloignés taxonomiquement, notamment parce que la forte variabilité des marqueurs AFLP réduit la signification phylogénétique des similarités entre taxa distants (les similarités distinguées peuvent être dues bien plus au hasard qu'à l'évolution entre espèces) (Mueller & Wolfenbarger, 1999).

4.4.2 Analyse génétique des populations

Les AFLP ont trouvé leur application la plus large dans l'analyse des variations génétiques au niveau intraspécifique, particulièrement dans l'étude de la structuration de population et la

différentiation entre populations. On trouve ainsi de nombreux exemples d'études de génétique de population pour aider à la conservation d'espèces végétales menacées (Ananthawat-Jonsson *et al.*, 1999; Keiper & McConchie, 2000; Palacios *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 1999). Son utilisation dans l'étude des populations fongiques est moins importante, mais en plein développement (Majer *et al.*, 1996; Mueller & Wolfenbarger, 1999; O'Neill *et al.*, 1997; Pei & Ruiz, 2000)

4.4.2.1 Estimation des similarités génotypiques

Les similarités génotypiques entre individus sont le plus souvent estimées par analyses phénétiques. Les profils AFLP sont tout d'abord transformés en matrice 0/1, où 0=absence de bande et 1=présence de bande. De cette matrice vont être déduites des distances, qui rendent compte de la similarité ou distance entre deux profils. Ces distances ou similarités sont calculées par différents coefficients (pour une revue de ces différents coefficients de similarité, voir Sneath & Sokal, (1973)).

Dans la littérature, les indices les plus souvent utilisés sont le "simple matching coefficient", puis l'indice de Dice, l'indice de Jaccard, et le coefficient de Nei et Li (Tableau S.8).

Ces différents coefficients se différencient les uns des autres notamment par le poids donné aux concordances d'absence ou présence (0-0: absence de bande chez les deux individus comparés, au locus considéré).

Schnieder *et al.* (1998) justifient l'emploi du coefficient de Jaccard en considérant que l'absence d'une bande RAPD peut avoir différentes causes. Prendre en compte la concordance mutuelle d'absence de bande dans ces conditions fausserait l'estimation de similarité. Cette argumentation est d'ailleurs reprise par Rosendahl & Taylor (1997) : la perte d'un fragment AFLP peut avoir plusieurs origines (perte de site de restriction ou défaut d'amplification par changement d'une base).

Cependant, Skroch (1992) (cité par Vandemark *et al.* (2000)) considère que pour une étude de similarité intraspécifique, l'inclusion des concordances négatives donne une information pratiquement similaire à l'inclusion des concordances positives sur l'homologie de séquences entre les deux individus testés. Suivant le même raisonnement, Bussell (1999) conclue que le "simple matching coefficient" (SMC) semble le plus approprié lorsque l'on compare des organismes taxonomiquement très proches.

Peu d'auteurs ont comparé les résultats donnés par différents coefficients de similarité, si l'on excepte l'étude complète de Divaret & Thomas (1998) sur Crucifères. (O'Neill *et al.* (1997) et Pei & Ruiz (2000) constatent que le coefficient de Jaccard donne des similarités moins fortes

que le SMC, alors que le SMC et l'indice de Nei donnent des résultats similaires (Pei & Ruiz, 2000). Pongam *et al.* (1999) constatent que le SMC et l'indice de Dice donnent des groupements et des similarités identiques. Vandemark *et al.* (2000) suggèrent que la méthode de Skroch donne une meilleure estimation des relations génétiques que l'indice de Nei, lorsque la majorité des bandes sont monomorphes.

Lorsque les distances phénétiques entre individus sont calculées, une classification, généralement hiérarchique ascendante, est effectuée afin de constituer des groupes homogènes et d'en déduire un arbre. La méthode UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method using arithmetic Average) est la plus couramment utilisée.

4.4.2.2 *Evaluation de la diversité génique et génotypique, des structures de population*

La technique AFLP, en tant qu'empreintes génétiques, permet de révéler des marqueurs à plusieurs loci, caractérisant ainsi des génotypes multilocus. Grâce à cette technique, on peut tout d'abord estimer la diversité génotypique d'une population : nombre de génotypes, et fréquence dans une population. Cette diversité est dépendante du mode de reproduction de l'organisme.

On peut également estimer la diversité génique, basée sur le nombre et la fréquence des allèles à différents loci.

Rappelons brièvement que "dans une population isolée de taille infinie, non soumise à la sélection, et dans laquelle il n'y a pas de mutation, les fréquences alléliques restent constantes. Si les accouplements sont panmictiques, les fréquences génotypiques se déduisent directement des fréquences alléliques p et q (respectivement fréquences de l'allèle dominant A et de l'allèle récessif a en un locus donné) selon les formules $p(AA)=p^2$, $p(aa)=q^2$ et $p(Aa)=2pq$." (Loi de Hardy-Weinberg, énoncée dans Henry & Gouyon (1998)).

Dans la nature, ces conditions ne sont jamais réunies. L'écart des fréquences alléliques par rapport aux proportions de Hardy-Weinberg peut avoir pour origines le mode de reproduction de l'agent pathogène, mais aussi un certain nombre de pressions évolutives : le hasard lié à un effectif fini, la sélection, la mutation, la migration (Henry & Gouyon, 1998; McDonald, 1997).

Pour évaluer la diversité génique dans plusieurs populations, la structuration de cette diversité dans et entre les populations (par les estimateurs de Wright F_{is} , F_{st} , F_{it} par exemple), il faut pouvoir calculer les fréquences alléliques à chaque locus considéré.

Un système de marqueurs idéal est celui dans lequel (i) les fragments de même taille sont homologues, c'est-à dire correspondant à un même locus ; (ii) les bandes sont complètement reproductibles ; (iii) tous les allèles d'un locus peuvent être identifiés, et (dans le cas des diploïdes) il n'y a pas d'allèles nuls ; (iv) les marqueurs sont indépendants les uns des autres dans chaque sous-population; (v) aucun marqueur n'est sélectionné, lié à un gène sélectionné ou en déséquilibre de liaison avec un gène sélectionné dans toute sous-population ; (vi) la plupart des allèles sont à des fréquences intermédiaires (Brown, 1996).

Il est très rare de remplir toutes ces conditions à la fois. Les AFLP, comme les RAPD, ont le défaut d'être des marqueurs dominants. L'évaluation de la diversité génétique et des structures de population suivra des démarches différentes selon le statut génétique de l'organisme.

4.4.2.2.1 Sur organismes haploïdes

Sur les organismes haploïdes, tels que la plupart des champignons ascomycètes, on considère que la présence et l'absence d'une bande RAPD ou AFLP sont deux allèles alternatifs au même locus. Les fréquences alléliques sont donc calculées sans aucun problème, ainsi que la diversité génique de Nei (H) (Nei, 1978), les déséquilibres gamétiques entre paires de loci, et les mesures classiques de partitionnement de la diversité génique (Fis, Fst, Fit de Wright (Henry & Gouyon, 1998)). Par ailleurs certains auteurs choisissent de ne travailler que sur les loci de fréquences intermédiaires : 30-70% (Bardin *et al.*, 1999) ou 20-80% (Majer *et al.*, 1998).

La diversité génétique et la structure des populations de *Pyrenopeziza brassicae*, champignon parasite foliaire du colza (Majer *et al.*, 1998), et de celles de *Leptosphaeria maculans* en Australie (Purwantara *et al.*, 2000) ont ainsi été étudiées par AFLP. Majer *et al.* (1998) a d'ailleurs démontré que les marqueurs détectés dans le génome de *Pyrenopeziza brassicae* ségrégeaient bien indépendamment.

4.4.2.2.2 Sur organismes diploïdes

Dans le cas d'organismes diploïdes (champignons, végétaux supérieurs et animaux), le caractère dominant des AFLP pose problème, puisque l'on ne peut distinguer les génotypes homozygotes des génotypes hétérozygotes.

Différentes stratégies ont alors été adoptées: l'une faisant appel à un estimateur de fréquences alléliques corrigé pour la dominance, les autres à l'analyse de la diversité génotypique multilocus.

4.4.2.2.1 Estimation des fréquences alléliques par la méthode de Lynch & Milligan (1994)

Lynch et Milligan ont proposé en 1994 un estimateur des fréquences alléliques p et q , corrigé pour la dominance, par l'utilisation d'expansions de Taylor de second ordre (Lynch & Milligan, 1994). Utilisée primitivement sur RAPD (Malvick & Percich, 1998a), cette démarche a été notamment mise en oeuvre sur de nombreuses analyses de populations végétales : fougères Australiennes (Keiper & McConchie, 2000), Rubiacée du bassin Péruvien de l'Amazonie (Russell *et al.*, 1999), *Limonium dufourii* de Méditerranée (Palacios *et al.*, 1999).

Ces estimations de fréquences impliquent 4 conditions nécessaires: (i) les marqueurs ségrègent de façon mendélienne (les loci sont indépendants), (ii) les fragments de même taille (allèles dominants) sont de status identique dans et entre les populations (iii) les fragments non-amplifiés (allèles récessifs) sur un locus sont de status identique dans et entre les populations et (iv) les allèles des différents loci sont en équilibre de Hardy-Weinberg (Yan *et al.*, 1999).

La vérification de la condition (i) nécessite l'analyse de descendance, comme l'avaient fait Majer *et al.* (1998) sur *Pyrenopeziza brassicae*. Dans le cas de ce modèle, les marqueurs étaient effectivement indépendants.

La vérification de la condition (ii) nécessite l'analyse de séquence, par séquençage ou méthode indirecte. Rosendahl & Taylor (1997) ont montré par SSCP que la plupart des fragments amplifiés de même taille ont des séquences identiques.

La condition (iii) semble difficile à remplir, car le phénotype "absence d'amplification" peut avoir différentes origines.

Enfin, la condition (iv) est impossible à vérifier par les seuls marqueurs AFLP, dominants. Elle peut être en revanche testée par l'utilisation d'un autre système de marqueurs codominants. Russell *et al.* (1999) ont ainsi vérifié l'hypothèse d'équilibre de Hardy-Weinberg par une étude préliminaire utilisant un locus microsatellite. Yan *et al.* (1999) ont en revanche montré par comparaison RFLP-AFLP (sur le moustique vecteur de la fièvre jaune) que

l'équilibre de Hardy-Weinberg n'était pas respecté sur 1/3 des loci RFLP, et que l'hétérozygotie détectée par AFLP était deux fois moindre que celle détectée par RFLP.

4.4.2.2.2 Estimation de la diversité génotypique: Indice de Shannon

Dans ce cas, on quantifie et on partitionne la diversité génétique par une approche qui ne nécessite pas d'estimation d'hétérozygotie: l'indice de diversité génotypique de Shannon. Cette stratégie a été pratiquée sur RAPD par Bussell (1999), et sur AFLP par Travis *et al.* (1996), Pei *et al.*, (2000) et Purwantara *et al.* (2000).

Cet indice serait 'relativement insensible au biais causé par l'inaptitude à détecter des loci hétérozygotes' (Dawson *et al* (1995), cité par Bussell, (1999)).

L'indice est calculé dans chaque population et sur chaque locus par la formule :

$$H'_j = - \sum p_i \log_2 p_i ,$$

où p_i = fréquence de présence ($i=1$) ou absence ($i=2$) d'une bande RAPD ou AFLP.

Dans cette formule, \log_2 est utilisé à la place de \ln (Lebreton, 1998; Bussell, 1999), car c'est une mesure plus simple pour les RAPD et AFLP: elle donne une diversité maximale par locus de 1 lorsque les données sont binaires. Le maximum est en effet atteint pour les données binaires lorsque $p(1)=p(0)=0.5$. La distribution des valeurs possibles de H'_j est symétrique (pour une fréquence donnée a , la valeur H'_j sera la même que ce soit $p(0)$ ou $p(1)$ qui soit égales à a).

De cet indice peuvent être déduits plusieurs estimateurs de diversité intra- et inter-populations.

4.4.2.2.3 Test du déséquilibre de liaison multilocus (I_a)- différenciation des populations (θ)

- L'association non aléatoire des loci entre eux, ou déséquilibre de liaison multilocus, peut être estimée par l'indice d'association (I_a) développé par Burt *et al.* (1996). Cet indice permet de tester la présence ou non de recombinaison dans une population, et de pouvoir émettre des hypothèses sur son mode de reproduction (sexualité ou clonalité, allogamie ou autogamie).

Cette méthode a été appliquée par Rosendahl & Taylor, (1997) pour étudier le mode de reproduction d'endomycorhizes du genre *Glomus* (*Glomus mossae* et *G. caledonium*).

-
- La différenciation entre populations peut être également estimée, sur les fréquences de marqueurs, par la statistique θ (Weir, 1996), qui est en fait la formulation du F_{st} de Wright pour les haploïdes.

La significativité de la valeur θ observée (pour rejeter l'hypothèse H_0 : "il n'y a pas de différenciation entre populations") est testée par comparaison à des θ obtenus sur les jeux de données où les individus ont été mélangés entre populations.

Problématique- présentation du sujet

La synthèse bibliographique que nous venons de présenter nous a permis d'éclairer un certain nombre de points relatifs à la nature et aux conditions de manifestation de la pourriture racinaire du pois. Elle a également apporté des précisions sur l'agent pathogène en cause, *A.euteiches* : taxonomie, particularités du cycle biologique liées à sa dépendance à une phase aquatique, à la faible durée de sa phase saprophytiquement active. Cette synthèse nous a en même temps permis de réaliser les nombreuses zones d'ombre qui demeurent concernant par exemple la persistance du champignon dans le sol et sa spécificité parasitaire, en particulier dans le contexte français compte-tenu de l'absence de travaux antérieurs sur cette maladie.

Nous avons vu que l'épidémie provoquée par *A.euteiches* en France est apparue assez brutalement il y a 8 ans, dans une région où la culture du pois était relativement ancienne (40 à 50 ans). Par la suite, l'agent pathogène s'est manifesté dans des régions toujours plus nombreuses, provoquant des dégâts rapidement très graves, même en présence d'un développement très récent du pois, comme c'est le cas en région Rhône-Alpes.

Les raisons du soudain développement de cette épidémie peuvent être multiples. Ces dernières années ont peut-être connu des conditions climatiques (printemps doux et humide) particulièrement favorables à la multiplication du champignon et à l'expression de la maladie. Des souches agressives de l'agent pathogène ont également pu être introduites de pays touchés, même si cette hypothèse n'est sans doute pas la plus plausible. Enfin, un changement des pratiques culturales, notamment des rotations, peut avoir modifié les équilibres microbiens dans les sols, au profit d' *A. euteiches*, et plus particulièrement au profit de populations bien adaptées au pois.

Comme nous l'avons souligné dans la synthèse bibliographique, les moyens de lutte à opposer à cette maladie ne sont pas légion. La seule stratégie efficace est actuellement l'évitement des parcelles contaminées, mais on ne sait pas si la culture d'autres Légumineuses dans ces parcelles présente un risque de multiplication du champignon qui rendra de toute façon la culture du pois impossible, voire même un risque d'adaptation ou de sélection de souches agressives sur ces nouvelles cultures. La piste variétale apparaît comme l'une des voies les plus prometteuses de lutte active, et un certain nombre de lignées américaines sont de bons

candidats. Mais on ne connaît pas l'efficacité de ces lignées en conditions françaises, ni la durabilité de ces résistances dans notre contexte.

Pour avancer dans l'explication de ce phénomène, et pour progresser dans la recherche de solutions adéquates, il était donc indispensable de connaître la variabilité des populations françaises d' *A. euteiches* en terme de spécificité du pouvoir pathogène vis-à-vis du pois, mais également vis-à-vis de Légumineuses susceptibles d'expliquer le maintien et la multiplication du parasite, ou de devenir sa prochaine cible.

Dans le même sens, et afin de chercher à préciser l'origine de la maladie en France, mais aussi de prévenir son évolution par l'estimation du potentiel d'adaptation du champignon, il nous a semblé important d'appréhender le mode de structuration génétique des populations d'*A.euteiches*, notamment en liaison avec la spécialisation pathogène et la distribution actuelle sur le territoire.

Enfin, compte-tenu de l'antériorité de développement de cette maladie sur d'autres continents, et aussi de l'antériorité de travaux de recherche menés notamment aux USA, la comparaison des populations françaises d'*A.euteiches* à des souches d'origine très diversifiée, pouvait donner une dimension supplémentaire à ce type d'étude.

Pour répondre à ces objectifs, une collection d'isolats d' *A.euteiches*, représentative des principales régions françaises productrices de pois, a été constituée entre 1995 (année de forte expression de maladie) et 1998, grâce à l'aide du LNPV Centre. Cette collection a été comparée à un panel de souches d' *A.euteiches* originaires de différents continents (USA et Canada, Scandinavie, Australie et Nouvelle-Zélande), et ayant servi pour certaines d'entre elles à de précédentes études d'épidémiologie et de recherche de sources de résistance, notamment aux USA. Suite aux informations fournies par la littérature, mais aussi à des essais préliminaires détaillés en Annexe 1 (montrant que des cultures monosporees présentaient la même spécificité d'hôte que leur souche parentale, que celle-ci soit polyphage ou très spécialisée), nous avons choisi de travailler avec des isolats-population (ou "mass isolates").

Cette collection a d'abord été caractérisée biologiquement :

- par analyse de la spécificité d'hôte sur différentes espèces de Légumineuses (Chapitre 1)
- par analyse de la variabilité de virulence et d'agressivité sur *Pisum sativum* (Chapitre 2)

L'utilisation d'empreintes génétiques AFLP a ensuite permis d'approcher la structure des populations du parasite, et de tester si la spécialisation pathogène et/ou l'origine géographique étaient des facteurs de structuration chez *A.euteiches* (Chapitre 3).

Tableau S.1 Distribution géographique de la pourriture racinaire due à *A. euteiches* à l'échelle mondiale, d'après la littérature internationale

4.4.2.3 <u>Origine</u>	Références	Espèces
4.4.2.4 Amérique du Nord		
⊗ Etats Unis : Etats de l' Est et du Centre (zone des grands lacs) – Etats du Nord-Ouest	(Jones & Drechsler, 1925) (Holub <i>et al.</i> , 1991; Papavizas & Ayers, 1974)	pois , haricot, luzerne, trèfle rouge
⊗ Canada : Ontario en 1973 Manitoba en 1979 Québec en 1989	(Basu <i>et al.</i> , 1973) (Lamari & Bernier, 1985) (Beghdadi <i>et al.</i> , 1992)	pois féverole pois , trèfle, luzerne
⊗ Jamaïque	(Papavizas & Ayers, 1974)	pois
Australie en 1955, Tasmanie en 1933	(Wade, 1955) (Allen <i>et al.</i> , 1987; Othieno Abbo & Irwin, 1990)	pois haricot, luzerne, trèfle souterrain
Nouvelle Zélande en 1977	(Manning & Menzies, 1980)	pois
Japon en 1974	(Yokosawa <i>et al.</i> , 1974)	pois
Europe		
Danemark en 1927	(Gram <i>et al.</i> , 1928)	pois
France en 1933	(Labrousse, 1933)	pois
Angleterre et Pays de Galle en 1951	(Beaumont, 1951) (Salt & Delaney, 1986)	pois féverole
Sud de la Suède en 1967	(Olofsson, 1967)	pois
Norvège	(Sundheim & Wiggen, 1972)	pois
région non chernozem de l' URSS = Russie occidentale, Biélorussie	(Kotova, 1979)	pois
Pologne	(Furgal-Wegrzycka, 1984)	pois
République Tchèque	(Ondrej, 1988)	pois
Hollande en 1989	(Oyarzun & van Loon, 1989)	pois

Tableau S.2: Espèces phytopathogènes dans le genre *Aphanomyces* (d'après Parke & Grau (1992) et Larsson (1994))

Espèces	Hôtes	Référence
<i>A. brassicae</i>	chou-fleur	(Singh & Pavgi, 1977)
<i>A. camptostylus</i>	avoine	(Drechsler, 1929)
<i>A. cladogamus</i>	tomate	(Drechsler, 1929)
	épinard	(Larsson, 1994)
<i>A. cochlioides</i>	betterave	(Drechsler, 1929)
	épinard	(Larsson, 1994)
<i>A. euteiches</i>	légumineuses	(Jones & Drechsler, 1925)
<i>A. iridis</i>	iris	(Ichitani <i>et al.</i> , 1986)
<i>A. raphani</i>	radis	(Kendrick, 1927)

Tableau S.3 Récapitulatif des études de virulence d'*Aphanomyces euteiches* sur pois

• Beute et Lockwood, 1967

15 isolats américains testés

Hôtes différentiels	Miragreen	Early Perfection	PI175232	PI169604	PI180693	PI166159	Nombre d'isolats
race 1	5.5 ^a	3.5	1.5	1.7	0.8	0	14
race 2	0.2	4	2	0	0	0	1

^a Indice de maladie, calculé d'après l'aire sous la courbe de mortalités de plantes entre le 5^{ème} et 16^{ème} jour après inoculation

• Sundheim, 1972

14 isolats norvégiens testés

Hôtes différentiels	Miragreen	Early Perfection	PI175232	PI169604	PI180693	PI166159	Nombre d'isolats
race 1	+	+	+	+	-	-	7
race 2	-	+	+	-	-	-	-
race 3	+	+	+	+	-	+	1
race 4	+	+	+	+	+	-	4
race 5	+	+	+	+	+	+	2

+ virulent d'après le pourcentage moyen de plantes mortes 10 jours après inoculation
- non- virulent (pas de seuil précis décrit)

• Malvick et Percich, 1998a

114 isolats Américains testés

Hôtes différentiels	MN313	MN314	90-2079	WI8904	Little Marvel	Nombre d'isolats
Groupe mineur	+	+	+	+	+	12
Groupe majeur	-	-	+	+	+	102

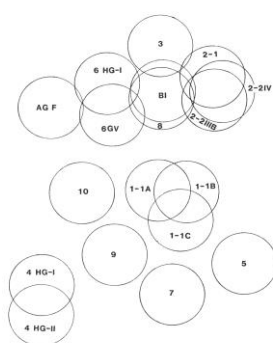
+ indice de maladie ≥ 2.5
- indice de maladie < 2.5

Tableau S.4 Liste des groupes d'anastomoses (AG) dans le complexe *Rhizoctonia solani*, avec information au sujet des systèmes de reproduction, marqueurs génétiques, et structure de population (d'après Cubeta & Vigalys, 1997)

Groupe d'anastomose	Système de reproduction	Marqueurs génétiques employés ^a	Structure de population
AG1	principalement hétérothallique ^b	Isozymes, ADNr, RAPD et RFLP	recombinante
AG2	supposé homothallique	Isozymes, ADNr, RAPD et RFLP	clonale/recombinante
AG3	supposé homothallique	Isozymes, empreintes génétiques, ADNr, scn DNA RFLP	clonale/recombinante
AG4	principalement hétérothallique ^b	ADNr, RFLP, RAPD	recombinante
AG5	?	ADNr RFLP	
AG6	?	ADNr RFLP	
AG7	?	ADNr RFLP	
AG8	principalement hétérothallique ^b	Isozymes, empreintes génétiques, ADNr, RAPD et RFLP	clonale/recombinante
AG9	?	Isozymes et ADNr RFLP	?
AG10	?	ADNr RFLP	?
AG11 ou AGBI	?	?	?

^a RAPD= randomly amplified polymorphic DNA, ADNr= ADN ribosomique; RFLP= restriction fragment length polymorphism; scnDNA= ADN nucléaire unicopie; ?= données non disponibles

^b Plusieurs AG à système de reproduction hétérothallique auraient aussi un comportement homothallique, par un processus nommé "fructification homocaryotique"



Relations entre groupes
d'anastomoses de

Tableau S.5 Classification de *Rhizoctonia solani* basée sur les affinités moléculaires (d'après de Vienne et Santoni, 1998)

Critère génétique	Critère moléculaire	
	Séquence (et insertion-délétion ^a)	Nombre de répétitions dans les ADN répétés

	Différence recherchée	Technique	Taille de l'unité de répétition	Technique
Codominants et révélés individuellement	Site d'enzyme de restriction (ER) Conformation	- RFLP - PCR ciblée puis CAPS PCR ciblée puis SSCP	1 à 4 nucléotides (microsatellites)	PCR ciblée puis électrophorèse en acrylamide ou agarose
Dominants et révélés "en masse" ("empreintes génétiques")	Site d'hybridation d'une amorce arbitraire Sites ER et amorce arbitraire	MAAP- PCR: - RAPD - DAF - AP-PCR AFLP	1 à 4 nucléotides (microsatellites) 5 à > 100 nucléotides (minisatellites)	ISSR^c (amorce microsatellite + quelques bases arbitraires) Southern avec sonde minisatellite

^a En dehors du cas particulier des ADN répétés (colonne de droite), il n'y a pas de technique spécifique pour révéler le polymorphisme d'insertion-délétion: celui-ci est mis en évidence par les techniques de révélation de différences de séquence.

^b Nous avons volontairement omis de mentionner la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), reposant sur les différences de stabilité

^c ISSR = Inter Simple Sequence Repeats : amplification intermicrosatellite – Ici les fragments amplifiés sont situés entre des locus microsatellites.

Tableau S.6 Caractéristiques des techniques de génération de marqueurs moléculaires (d'après Mueller & Wolfenbarger, 1998)

Critère	AFLP	RAPD	SSR	RFLP	Allozymes
Quantité d'information	haute	haute	haute	faible	faible
Reproductibilité	haute	variable	haute	haute	haute
Résolution des différences génétiques	haute	modérée	haute	haute	modérée
Facilité de développement et d'utilisation	moyenne	facile	difficile	difficile	facile
Durée de développement	courte	courte	longue	longue	courte

La technique idéale pour estimer de la variabilité génétique devrait satisfaire aux critères suivants :

- être bon marché et rapide à mettre en œuvre
- générer des marqueurs multiples et indépendants
- fournir une résolution adéquate des différences génétiques
- être reproductible et fiable
- nécessiter peu de matériel biologique et ADN
- ne pas nécessiter une grande expertise en biologie moléculaire
- ne pas nécessiter d'information préliminaire sur le génome de l'organisme à étudier

Aucune ne satisfait à toutes ces conditions. 5 techniques souvent employées sont notées ci-après selon ces critères.

Tableau S.7 Marqueurs moléculaires utilisés en caractérisation, phylogénie et biologie des populations

Techniques		Taxonomie- Caractérisation	Phylogénie	Biologie- Génétique des populations
PCR-RFLP (CAPS)	} sur ADNr, gènes "actine", "α-tubuline" "β-tubuline"	x	x	
PCR-SSCP		x	x	
séquençage		x	x	
RFLP				x
Microsatellites (SSR)				x
RAPD		x		x
AFLP		x	(x)	x

Tableau S.8 Coefficients de similarité utilisés en analyse phénétique

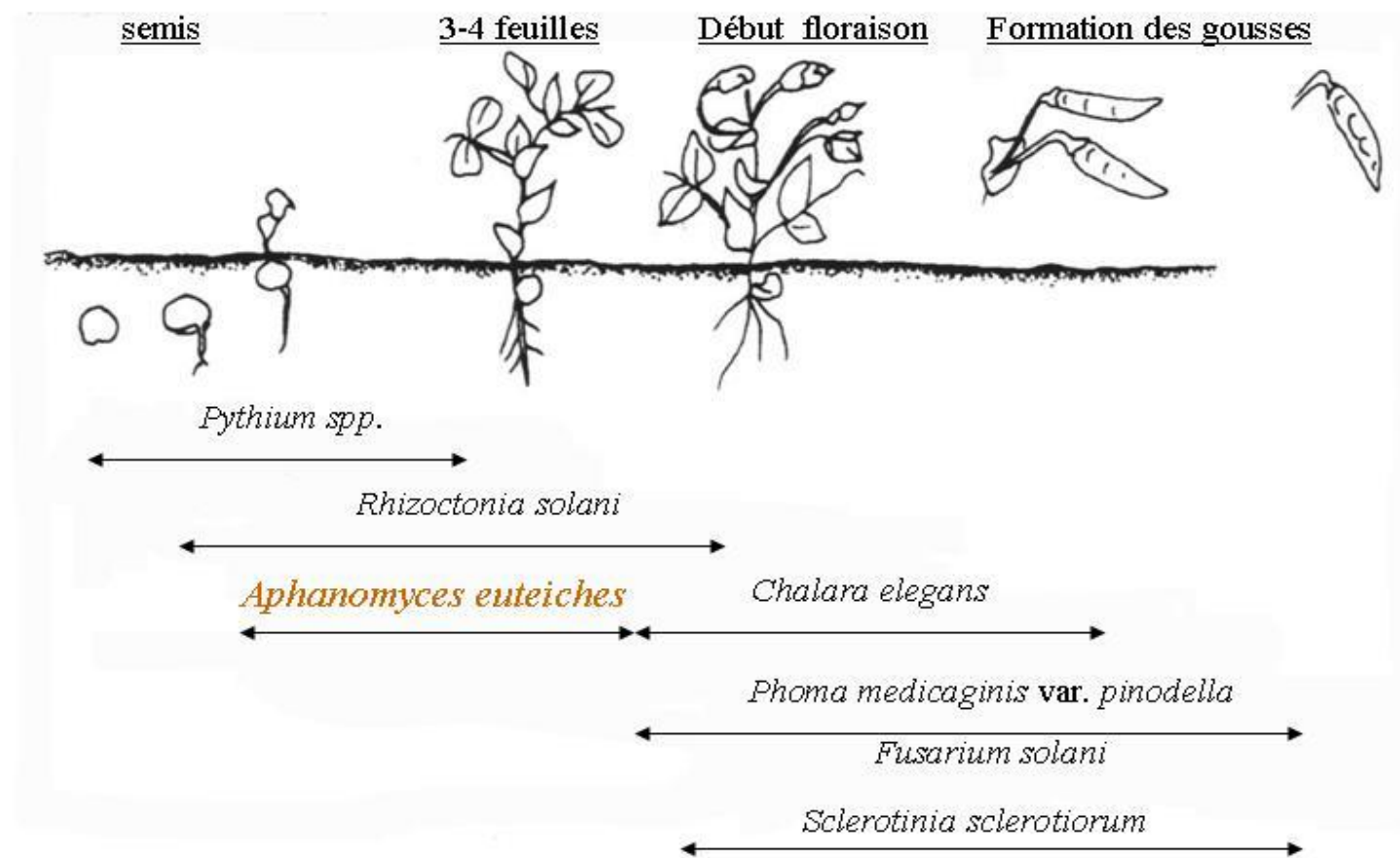
Coefficient de similarité	Formule	Organisme ^c	Référence
∂ Simple matching coefficient (Sneath & Sokal, 1973)	$S_{sm} = (n_{ab} + n_{..}) / (n_{ab} + n_{a.} + n_{.b} + n_{..})^a$	<i>Colletotrichum</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> (bactérie) <i>Claviceps africana</i> <i>Leptosphaeria maculans</i> <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Leptosphaeria maculans</i> <i>Melampsora epitea</i>	(O'Neill <i>et al.</i> , 1997) (Aarts <i>et al.</i> , 1999) (Tooley <i>et al.</i> , 2000) (Pongam <i>et al.</i> , 1999) (Gonzalez <i>et al.</i> , 1998) (Purwantara <i>et al.</i> , 2000) (Pei <i>et al.</i> , 2000)
• Indice de Dice (Sneath & Sokal, 1973)	$D = 2 n_{ab} / (n_{ab} + n_{a.} + n_{.b})$	RAPD- <i>Aphanomyces euteiches</i> RAPD- <i>Erysiphe cichoracearum</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Leymus</i> spp. (plante herbacée) <i>Mycosphaerella graminicola</i> <i>Leptosphaeria maculans</i>	(Malvick & Percich, 1998) (Bardin <i>et al.</i> , 1999) (Arenal <i>et al.</i> , 1999) (Anamthawat-Jonsson <i>et al.</i> , 1999) (Bonants <i>et al.</i> , 1999) (Pongam <i>et al.</i> , 1999)
\div Indice de Jaccard (Sneath & Sokal, 1973)	$S_j = n_{ab} / (n_{ab} + n_{a.} + n_{.b})$	<i>Colletotrichum</i> spp. <i>Glomus</i> spp. <i>Xanthomonas axonopodis</i> (bactérie) <i>Septoria tritici</i> <i>Melampsora epitea</i> <i>Sticherus flabellatus</i> (fougère) <i>Sasa senanensis</i> (bambou nain)	(O'Neill <i>et al.</i> , 1997) (Rosendahl & Taylor, 1997) (Restrepo <i>et al.</i> , 2000) (Schnieder <i>et al.</i> , 1998) (Pei & Ruiz, 2000) (Keiper & McConchie, 2000) (Suyama <i>et al.</i> , 2000)
\neq Indice de Nei & Li (1979)	$F = 2 n_{ab} / (n_{a.} + n_{.b})$	<i>Globodera</i> spp (nématodes) <i>Calycophyllum spruceanum</i> (plante Méditerranéenne) <i>Macrophomina phaseolina</i> <i>Melampsora epitea</i> RAPD- <i>Isotoma pretaea</i> (plante de rocher)	(Folkertsma <i>et al.</i> , 1996) (Russell <i>et al.</i> , 1999) (Vandemark <i>et al.</i> , 2000) (Pei <i>et al.</i> , 2000; Pei & Ruiz, 2000) (Bussell, 1999)
\equiv Distance de Skroch (1992) (in (Vandemark <i>et al.</i> , 2000))	$D_{ab} = (\sum A_i - B_i) / N^b$	<i>Macrophomina phaseolina</i>	(Vandemark <i>et al.</i> , 2000)

^a n_{ab} = nbre fragments communs (1-1); $n_{a.}$ = nbre fragments uniquement chez l'individu A (1-0); $n_{.b}$ = nbre fragments uniquement chez l'individu B (0-1); $n_{..}$ = nbre de fragments absents chez les 2 génotypes (0-0)

^b A_i et B_i = note (0 ou 1) de A et B respectivement, au $i^{\text{ème}}$ locus - N = nombre total de loci sur l'ensemble des échantillons.

^c Tous les modèles cités ici sont des champignons étudiés par AFLP, sauf exceptions mentionnées

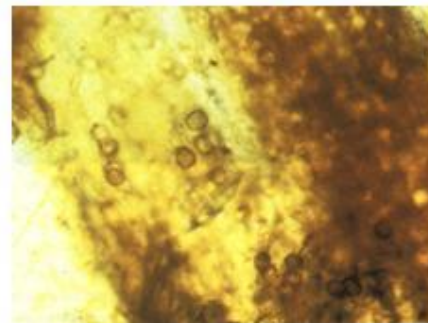
Figure S.1 Chronologie des attaques des différents parasites d'origine tellurique au cours du cycle cultural du pois (d'après Sanssené et Didelot, 1995)





Champ infesté, avec un foyer
déclaré ("rond jaune")
(stade début floraison)

Champ de pois de Seine-
et-Marne, avec dégâts
d'*Aphanomyces* (stade
remplissage des gousses)



Oospores d' *A.euteiches* dans
les racines de pois

Symptômes racinaires provoqués
par *A.euteiches* sur pois

Figure S.2 Symptômes aériens et racinaires sur la culture de pois, et oospores d' *A.euteiches* dans les racines

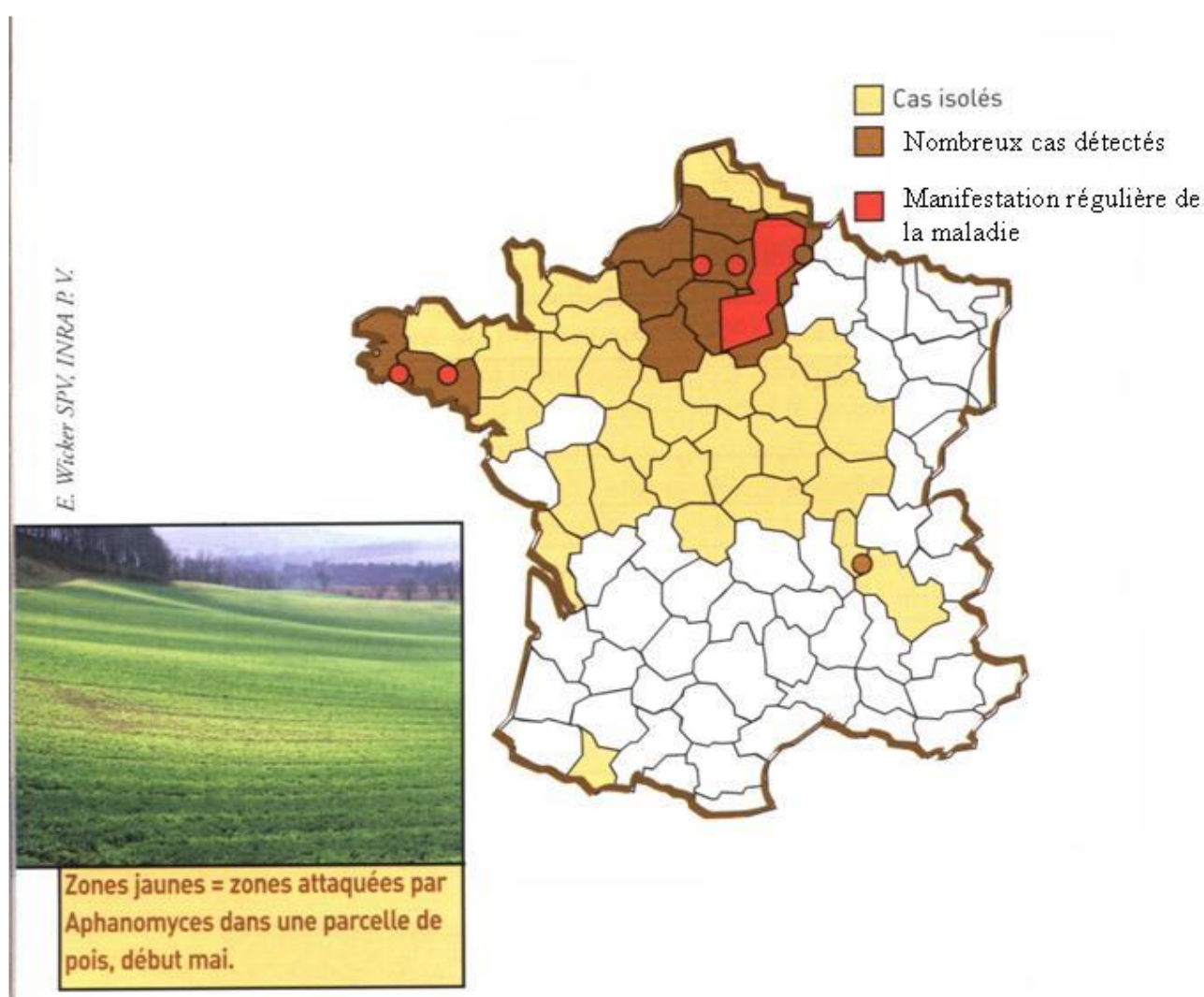


Figure S.3 Régions françaises touchées par *A. euteiches* en 2000 (d'après les tests de prédiction du Laboratoire National de la Protection des Végétaux de la région Centre (LNPV))

Source: "Pois protéagineux d'hiver et de printemps- Guide de culture 2001- UNIP-ITCF

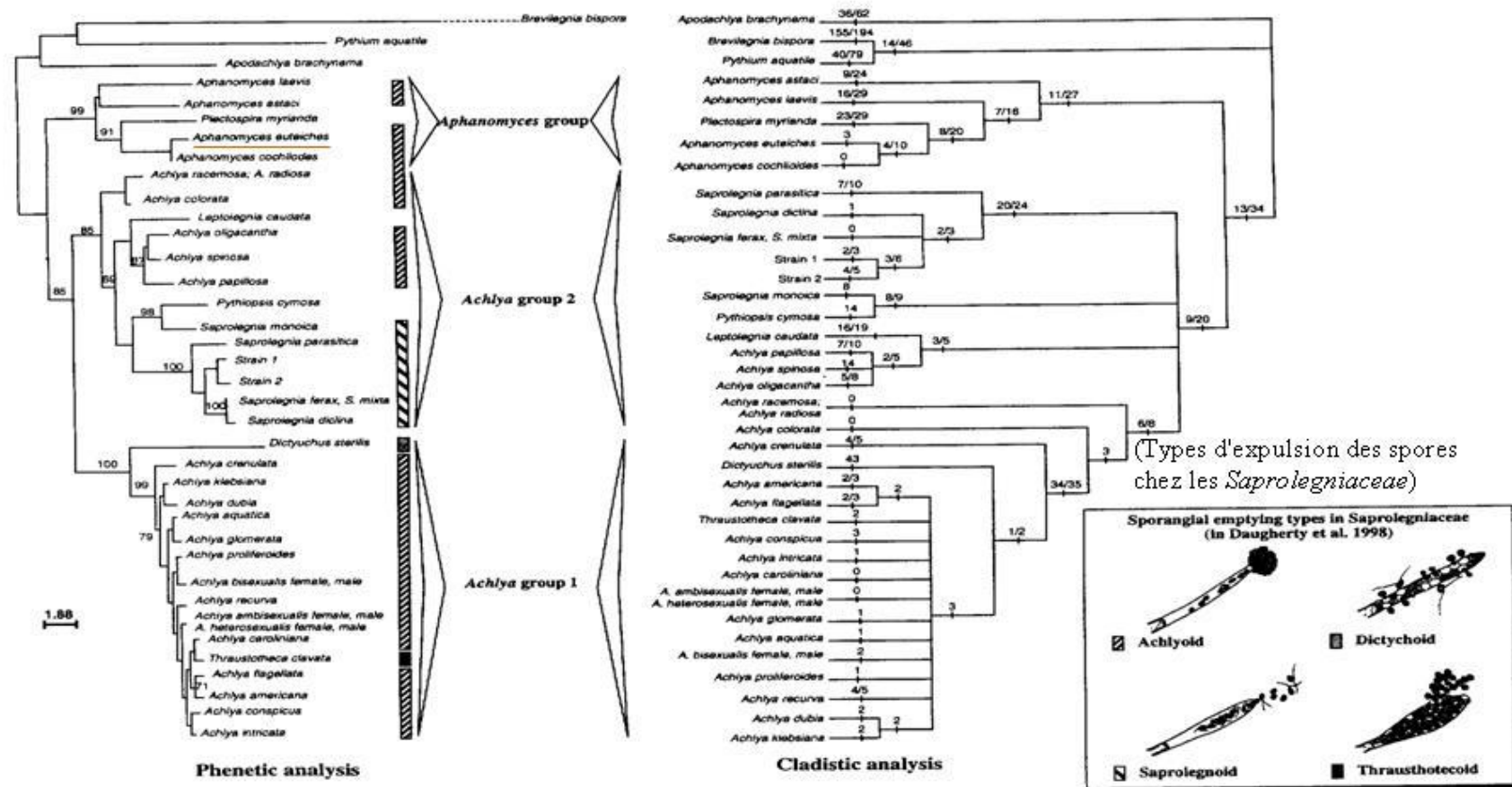


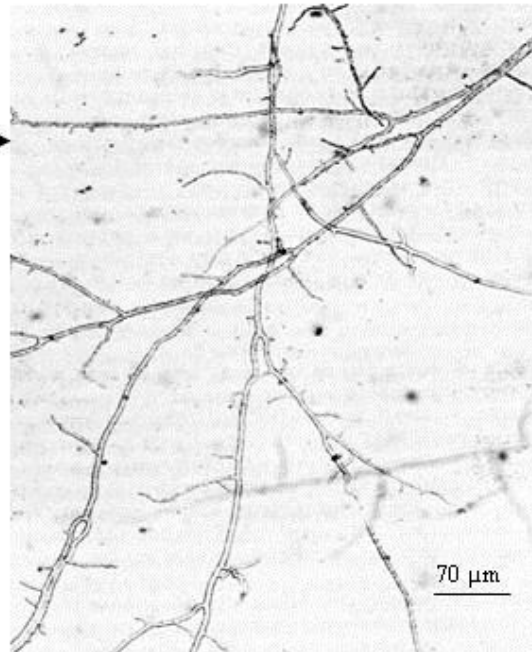
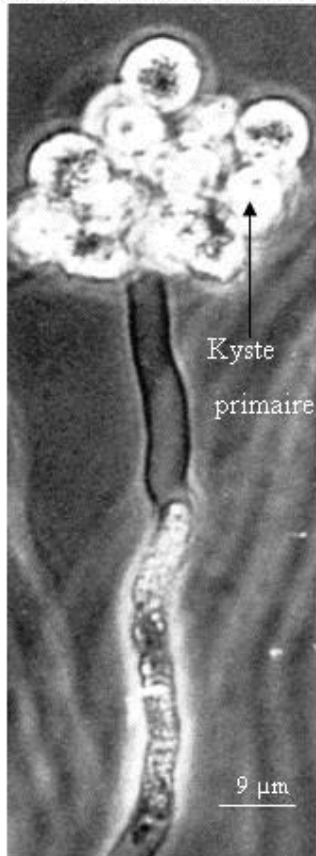
Figure S.4 Taxonomie moléculaire et morphologique des *Saprolegniaceae* (d'après Leclerc *et al.*, 2000)

A gauche: analyse phénétique : arbre de distances construit par la méthode "neighbour-joining" à partir des 622 alignements de séquence de LSU-rDNA. Les nombres sur les branches indiquent les valeurs de bootstrap supérieures à 70% (1000 répétitions). Barre=1.88% de divergence.

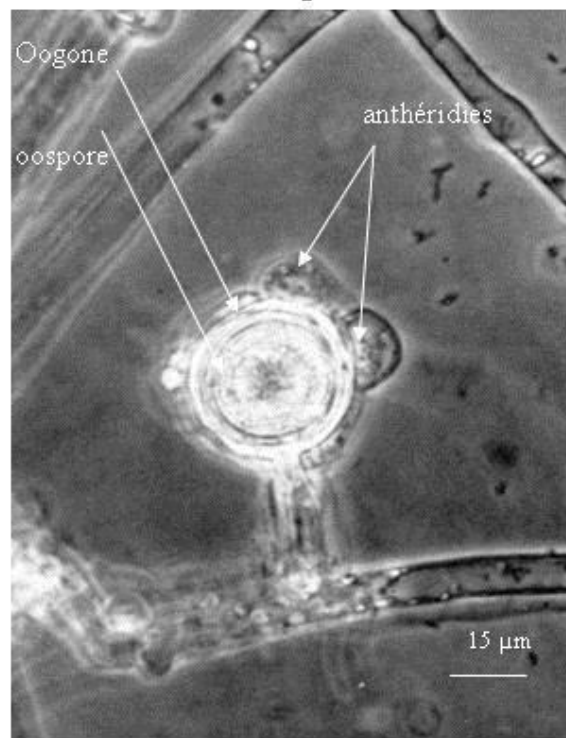
A droite: analyse cladistique : arbre strict consensus de 4279 arbres de parcimonie (PAUP 3.11). Les nombres sur les branches indiquent les nombres minimal/maximal de synapomorphies et autapomorphies

Mycélium asepté

Zoosporange filamenteux



Oospore



Zoospore biflagellée

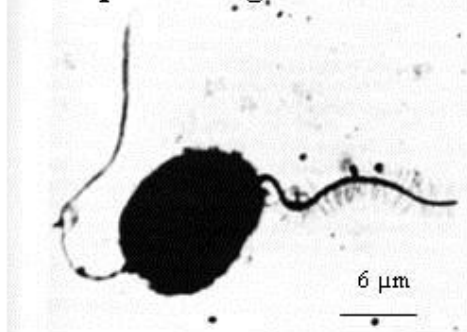
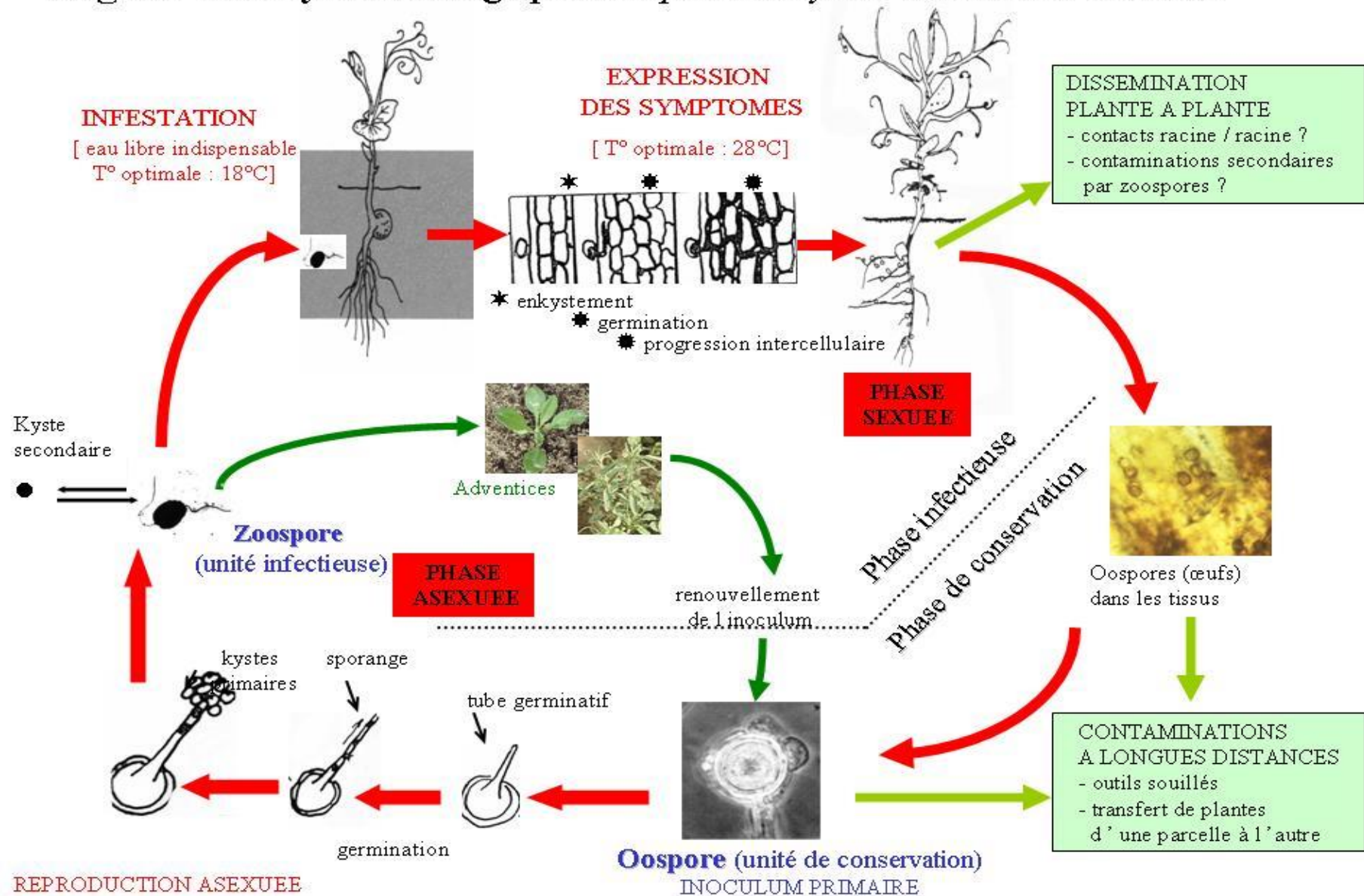


Figure S.5 Structures caractéristiques d' *Aphanomyces euteiches*

(source : DJ Hagedorn, 1984- *Compendium of pea diseases*)

Figure S.6 Cycle biologique d'*Aphanomyces euteiches* Drechs



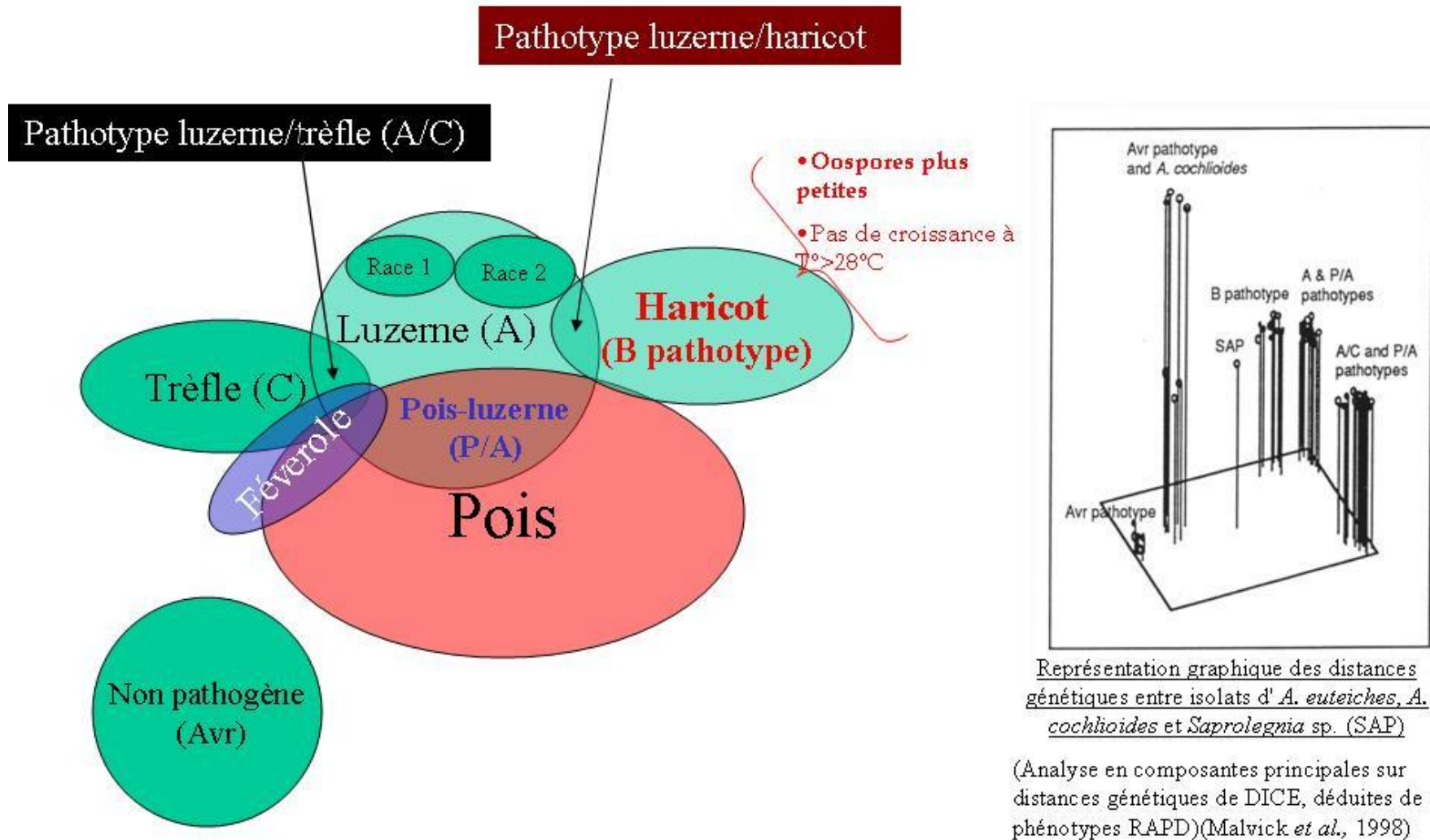


Figure S.7 Schéma résumant les caractéristiques phénotypiques (spécificité d'hôte) et génotypiques des populations américaines d' *A. euteiches*

(d'après Holub *et al.*, 1991; Grau *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998; Munkvold *et al.*, 2001)

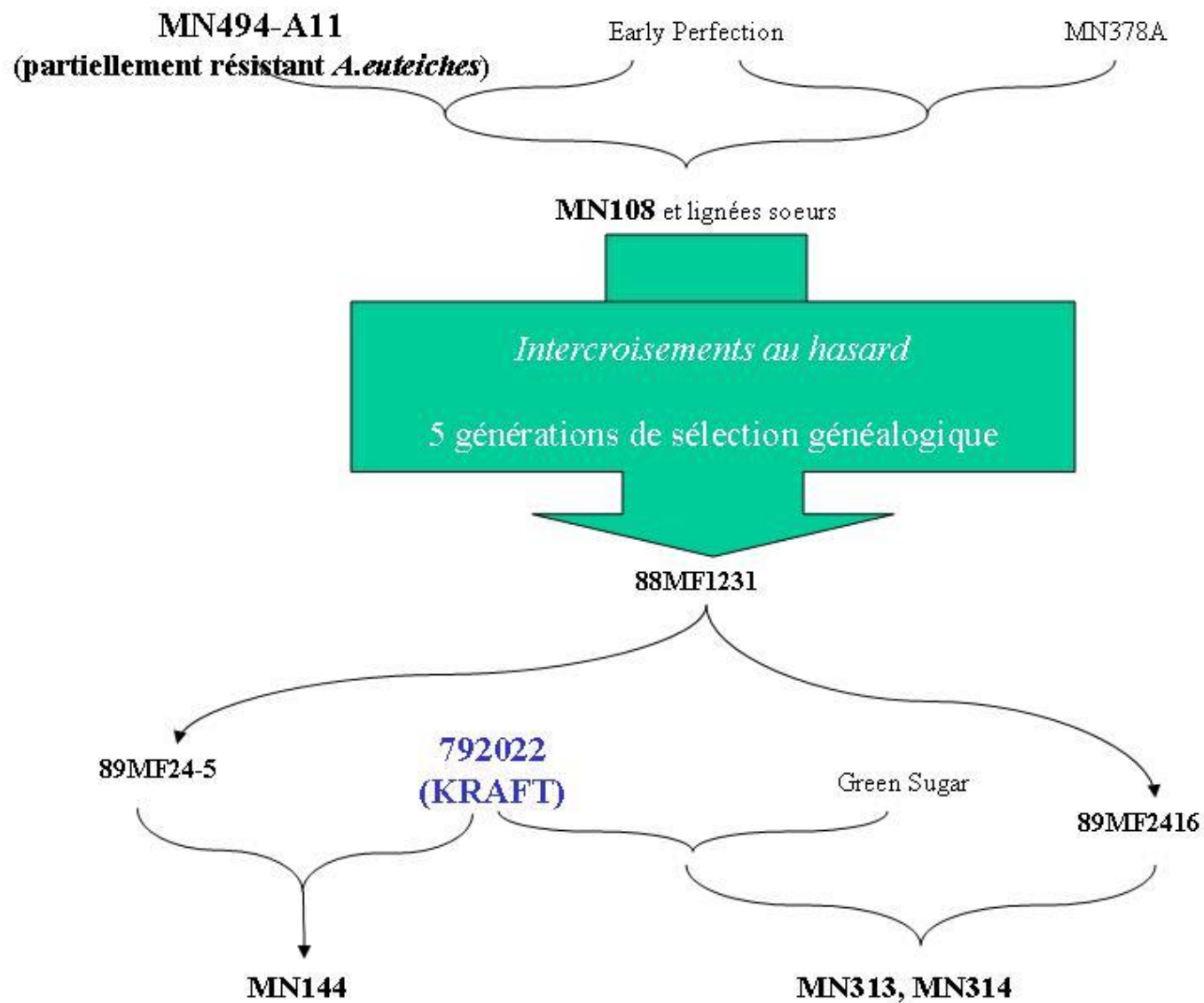


Figure S.8 Généalogie des lignées de pois sélectionnées par DW Davis (Université du Minnesota)

• *Lignées commerciales de Canner Seed Corp, Idaho*

• lignées tolérantes à *A.euteiches*- Univ. Du Minnesota (Davis)

• *lignées tolérantes à A.euteiches- Univ. Cornell- Geneva (NY- G. Marx)*

• lignées à large système racinaire

• les autres lignées sont choisies pour leur qualité agronomique (af= caractère "afila") et la résistance à l'oidium(er)

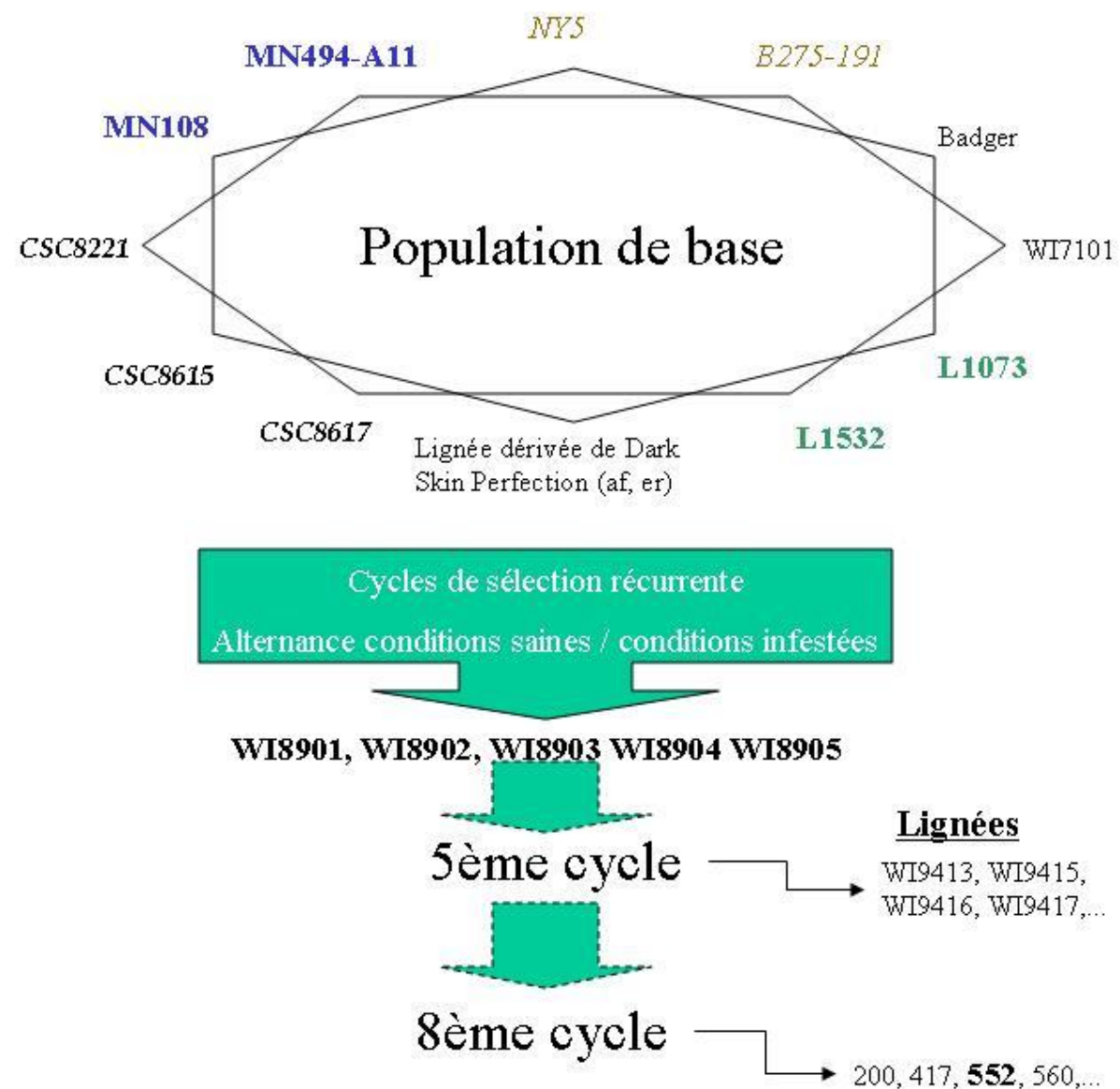


Figure S.9 Généalogie des lignées de pois sélectionnées par ET Gritton (Université du Wisconsin)

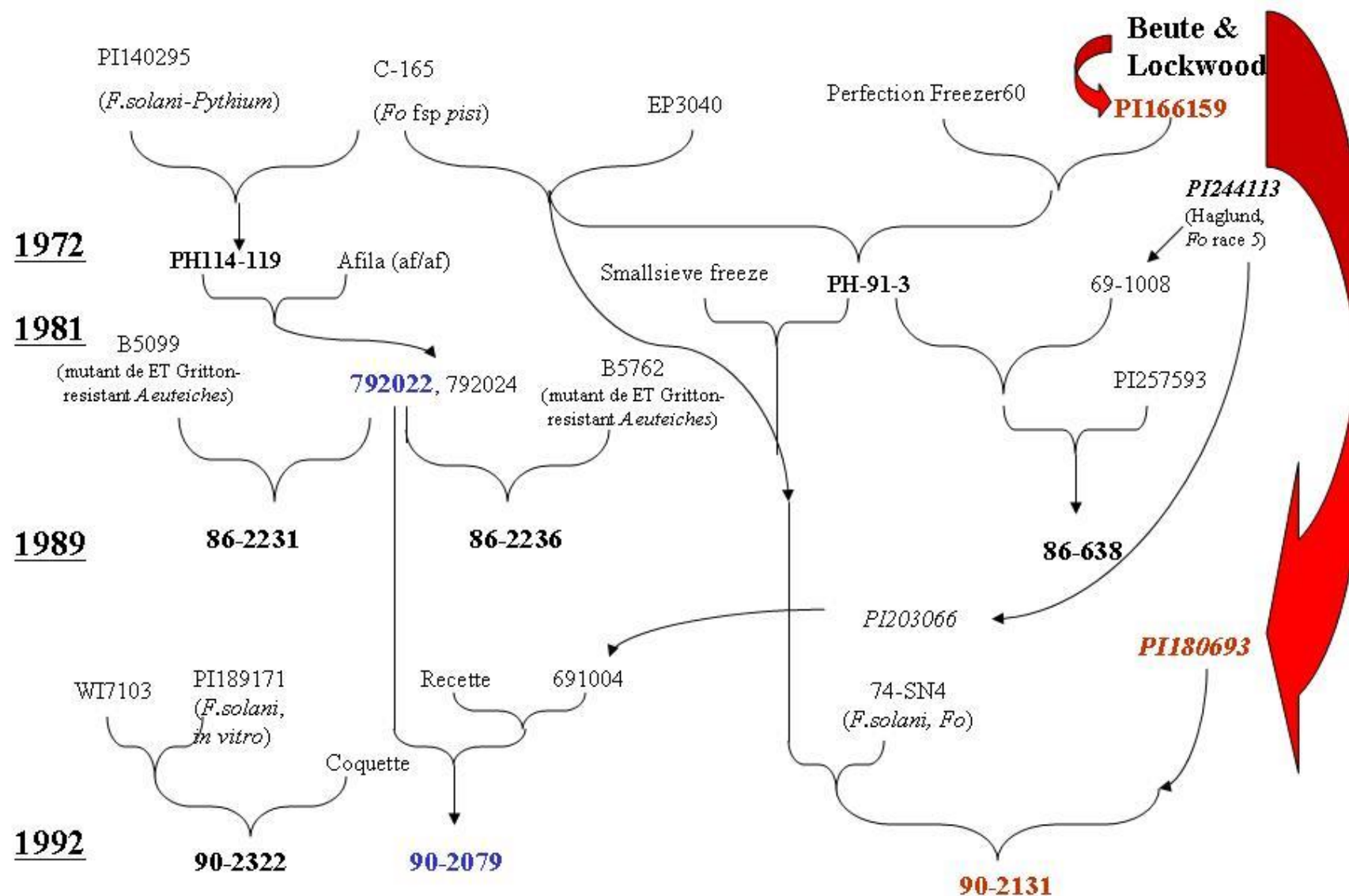


Figure S.10 Généalogie des lignées de pois sélectionnées par JM Kraft (USDA-Prosser)

Fsolani= résistance à *Fusarium solani*; *Fo*= résistance à *F. oxysporum*; *Ae*= résistance/tolérance à *A.euteiches*; *Py*=résistance à *Pythium ultimum*

Les dernières lignées déclarées (96-x et 97-x) sont dérivées de 792022, de 86-638, 74-SN3 et 74-SN5, 75-786

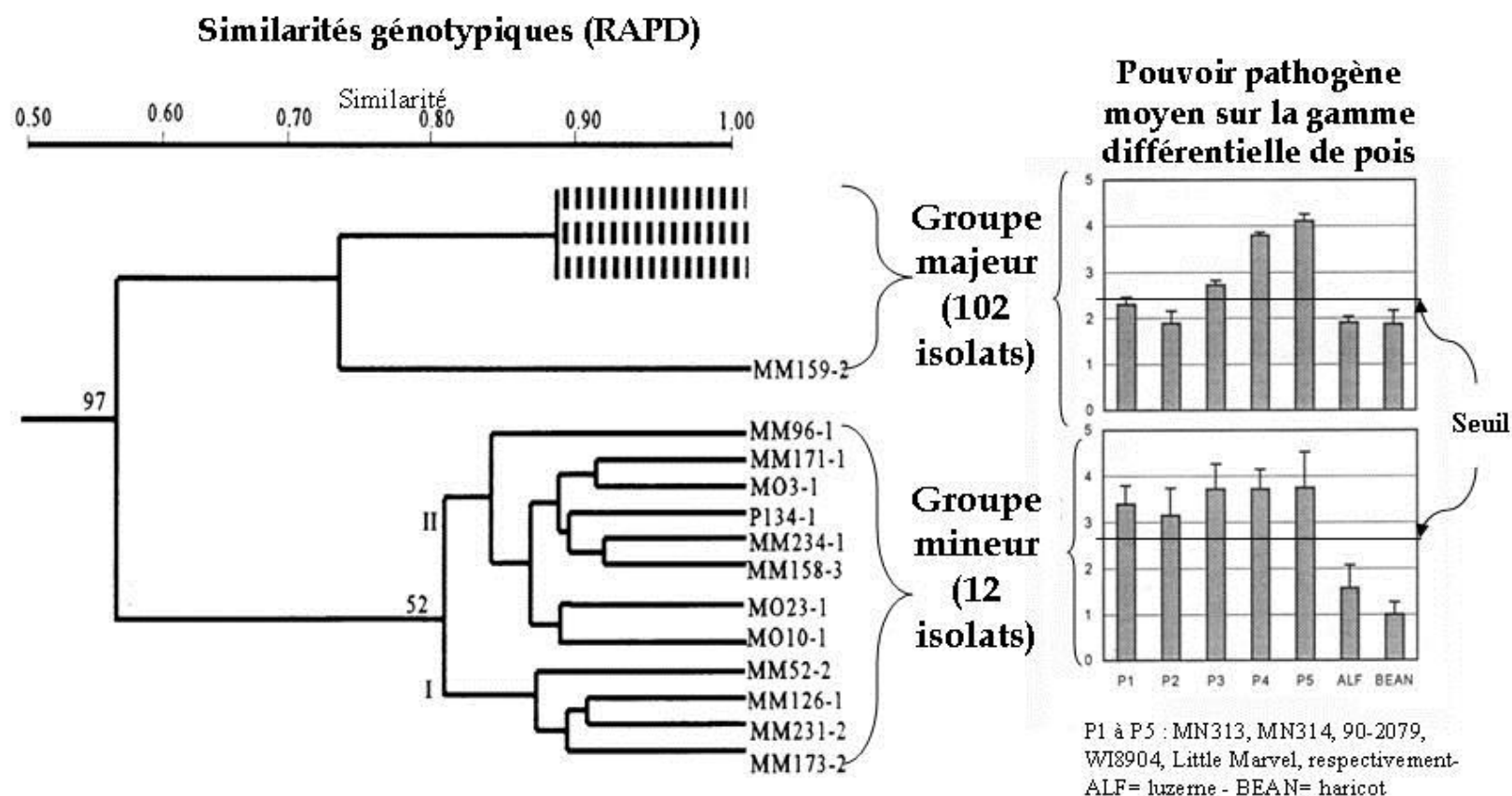


Figure S.11 Diversité génotypique et phénotypique (virulence sur pois) de 114 isolats d'*A. euteiches* du Minnesota, Wisconsin et Oregon (Malvick & Percich, 1998)

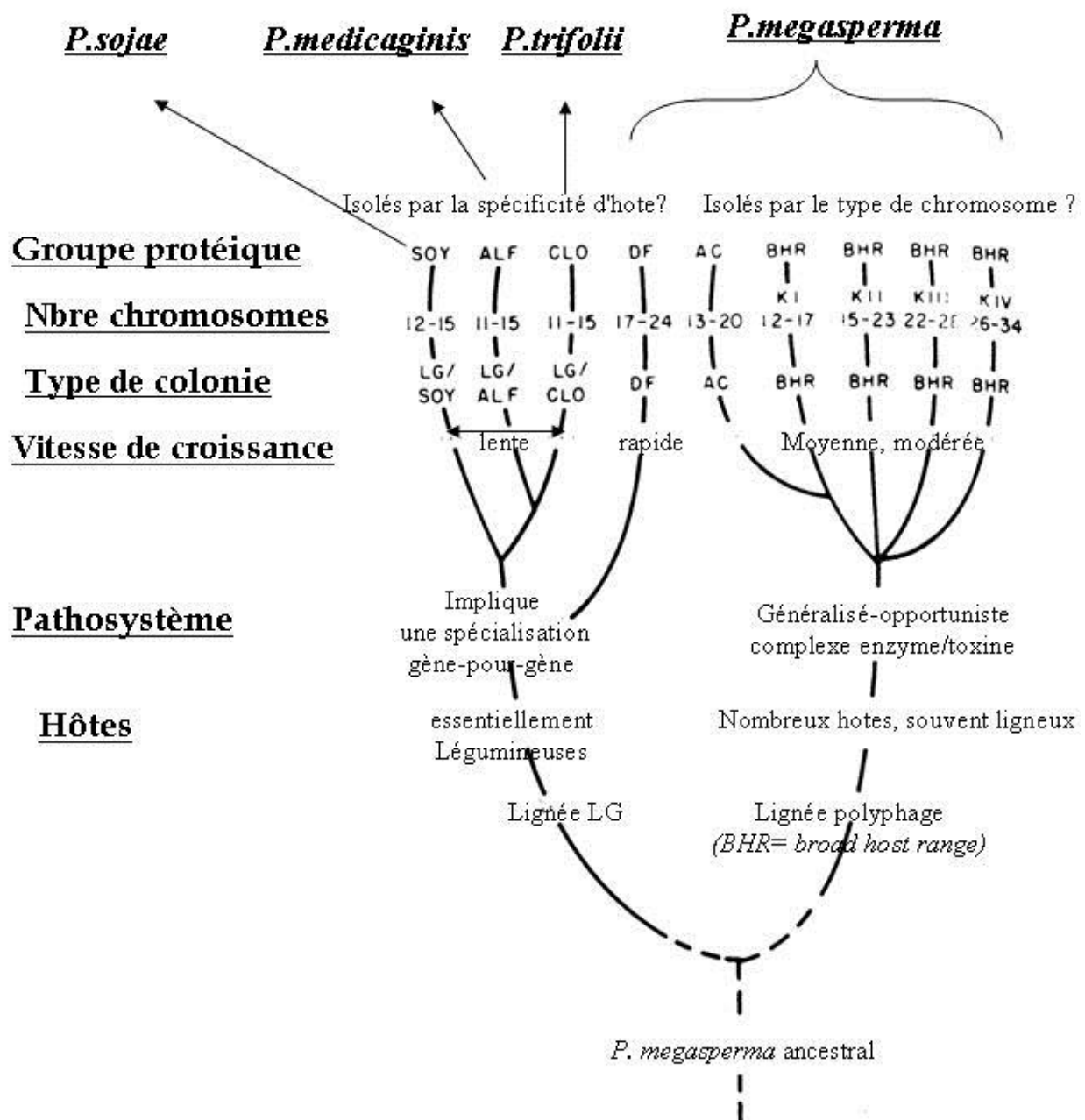


Figure S.12 Interprétation des relations entre les sous-groupes de *Phytophthora megasperma*, par une synthèse des différences de groupe protéique, nombre de chromosomes, morphologie et vitesse de croissance des colonies, et pouvoir pathogène (d'après Hansen (1987), et Hansen & Maxwell (1991))

SOY= souches "soja", ALF= souches "luzerne", CLO= souches "trèfle", DF= souches "Sapin de Douglas", AC= souches "pommier/cerisier", BHR= souches polyphages

Chapitre 1 : Spécificité
d'hôte des populations
françaises d' *Aphanomyces*
euteiches

Chapitre 1 : Spécificité d'hôte des populations françaises d' *Aphanomyces euteiches*

INTRODUCTION

La culture du pois a différents degrés d'ancienneté en France. Le pois potager, destiné à l'alimentation humaine, est implanté depuis pratiquement un siècle en Bretagne, et plus secondairement dans le Nord de la Seine-et-Marne. Le pois protéagineux, qui est utilisé comme source de protéines en alimentation animale, est de développement beaucoup plus récent (début des années 1980) ; il s'est étendu très vite à l'ensemble du Bassin Parisien, puis aux Pays de Loire, au Centre, Sud Ouest, et dernièrement en région Rhône-Alpes.

La pourriture racinaire à *Aphanomyces euteiches* s'est manifestée sur cette culture dans un contexte qui renferme plusieurs spécificités :

- La maladie, bien que décrite dès 1933 dans le Bassin Parisien, ne s'est ensuite jamais manifestée significativement jusqu'à 1993, alors que la culture du pois s'est fortement intensifiée à partir du début des années 1980. Or il n'est pas rare de mettre en évidence la maladie dans des parcelles qui n'ont jamais porté de pois (ou dont la dernière culture de pois remonte à 20 ou 30 ans). Comme nous l'avons déjà souligné, cette explosion soudaine de la maladie peut être due à la conjonction de plusieurs facteurs favorables (conditions climatiques, rotations), mais elle n'aurait pu avoir lieu sans la présence d'un inoculum primaire, dont l'origine demeure inconnue. Parmi les hypothèses explicatives, l'existence d' hôtes alternatifs, (Légumineuses cultivées ou sauvages) semble la plus plausible.
- Des cultures potentiellement sensibles à ce champignon sont mises en rotation avec le pois, en particulier dans des zones infestées par *A.euteiches*. La luzerne est cultivée principalement en Champagne, mais aussi dans l'Est de la Seine-et-Marne et Sud de l'Aisne, zones très touchées par *A.euteiches*. Le haricot, quant à lui, est régulièrement cultivé en rotation avec le pois potager en Bretagne, et avec le pois protéagineux en Eure-et-Loir. La féverole de printemps et la féverole d'hiver occupent les mêmes zones de production que le pois : Bassin Parisien, Ouest et Sud-Ouest. Pour autant, la maladie n' a jusqu'ici été mise en évidence que sur pois en France, alors qu'elle se manifeste sur d'autres Légumineuses à l'étranger (luzerne, haricot, trèfle aux Etats-Unis, trèfle et haricot

en Australie). Cette situation particulière incite à se demander si les populations françaises du champignon diffèrent des populations présentes sur d'autres continents : sont-elles spécifiques du pois, ou existe-t-il de la variabilité de spécificité d'hôte au sein de ces populations ?

Pour étudier cette spécificité, nous avons choisi, après différents essais préliminaires, de tester notre collection d'isolats d'*A.euteiches* sur cinq espèces de Légumineuses cultivées, choisies d'après leur intérêt présumé par rapport au problème *Aphanomyces*, mais aussi d'après la littérature internationale : pois, luzerne, féverole, haricot, vesce commune.

La spécificité d'hôte a été évaluée d'après le pouvoir pathogène d'isolats d'*A.euteiches* exprimé sur jeunes plantes en conditions contrôlées, après inoculation par zoospores (unités infectieuses).

Cette étude de spécificité d'hôte a été traitée à deux niveaux :

- L'échelle nationale et internationale a d'abord été choisie pour situer le comportement des isolats français d'*A.euteiches* issus de pois par rapport aux pathotypes définis antérieurement par les travaux américains (« pois », « luzerne », « haricot »). C'est l'objet de la partie I.
- Par la même méthodologie, nous avons ensuite estimé la variabilité de spécificité d'hôte du champignon à l'échelle parcellaire, d'une part à partir d'une culture de pois, et d'autre part par piégeage sur différentes Légumineuses. Ce sera l'objet de la partie II de ce chapitre.

PARTIE I : Caractéristiques de pathogénicité d'isolats d'*Aphanomyces euteiches* issus de pois en France

Article accepté le 22 Février 2001 dans Plant Pathology : "Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* recovered from pea in France"

Problématique et principe de la méthodologie utilisée

A.euteiches n'a été décrit en France que sur pois, malgré l'existence de rotations à risque pour d'autres Légumineuses dans certaines régions, et contrairement à ce qui a été observé sur plusieurs continents. Le premier objectif que nous nous sommes fixé a donc été de caractériser le statut de notre collection isolée de pois : les isolats sont-ils spécialisés sur cette espèce, ou sont-ils en fait préférentiellement pathogènes sur pois mais polyphages, capables par exemple d'attaquer aussi la féverole ? Cet aspect était particulièrement important à connaître dans un contexte où les agriculteurs des zones infestées par *A.euteiches* ont tendance (et sont incités) à remplacer le pois par la féverole (Figure 1.1).

Il était également important de savoir si les populations françaises d' *A.euteiches* différaient de celles présentes sur d'autres continents touchés. Notre collection a donc été comparée à un certain nombre d'isolats-référence étrangers, caractérisés aux Etats-Unis (phénotypes "pois", "luzerne", haricot" (Holub *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998)).

Après inoculation en conditions contrôlées de chaque isolat sur la gamme d'hôtes choisie, les symptômes racinaires ont été notés à une date (10 jours après inoculation), donnant un indice de nécrose (IN), sur une échelle de 0 à 5 (Figures 1.2 et 1.3).

Les données de pouvoir pathogène ont ensuite été traitées de deux manières:

- l'application d' un "seuil d'infection réussie" a permis de transformer les données d'IN en données discrètes, et de définir des « phénotypes de virulence » (ou groupes d'infection réussie) d'après leur spectre d'hôte. Le "seuil d'infection réussie" a été défini et validé expérimentalement, après des essais de réisolement et observation d'oopores dans les racines, à IN=1 pour chaque hôte et IN=2 pour le haricot.
- une analyse multivariée (AFCM) des données d'IN des isolats français a permis de regrouper les isolats selon leur profil de pathogénicité préférentielle, notion incluant la

virulence et l'agressivité sur chacun des hôtes. Cette technique a permis de définir des « pathotypes ».

4.4.2.4.1.1.1.1 PRINCIPAUX RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dix phénotypes de virulence ont été mis en évidence, sur l'ensemble du matériel testé ; parmi eux, quatre ne sont pas représentés dans la collection française (Table 1.1). Le phénotype pois-vesce-luzerne-féverole (PVAFF) est majoritaire.

Quatre pathotypes ont été mis en évidence (Figure 1.5), dont un polyphage (A), d'une agressivité moyenne à forte sur quatre des cinq espèces. Le pathotype majoritaire (B) est très agressif sur pois, moyennement agressif sur vesce et luzerne, peu sur féverole, non pathogène sur haricot.

Les isolats d'*A.euteiches* issus de pois, qu'ils soient français ou étrangers, sont préférentiellement pathogènes sur pois, mais non spécialisés sur cette espèce. Le concept de *forma specialis* « *pisi* » développé par Pfender et Hagedorn (1982) est donc fortement remis en question. En revanche, les isolats étrangers de haricot et luzerne sont pour leur part beaucoup plus spécialisés sur leur hôte d'origine et non-pathogènes sur pois (Figure 1.4).

Une majorité d'isolats a un comportement similaire (phénotype de virulence PVAFF, et pathotype B), et l'on ne note pas de spécificités régionales dans la fréquence des différents phénotypes. Cependant, différents degrés de spécificité sont observés, de la polyphagie à la spécialisation et moindre agressivité sur pois. Ces différents degrés de spécialisation pathogène incitent à rechercher l'existence de liens avec des caractères génotypiques.

Par ailleurs, deux résultats de cette étude ont des implications en épidémiologie. La sensibilité quasi universelle de la vesce commune, ainsi que sa fréquence dans les champs français, font de cette espèce un hôte potentiel de premier plan pour la pérennisation de l'agent pathogène. D'autre part, l'existence d'isolats agressifs à la fois sur pois et sur féverole fait craindre un possible développement de l'épidémie sur cette dernière espèce, surtout si elle se confirme comme culture de remplacement du pois dans les zones touchées au cours des prochaines années.

Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* from pea in France

E. Wicker^{ab*}, M. Hullé^b and F.Rouxel^b

^a Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en Protéines (UNIP) – 12, Avenue Georges V, 75008 Paris

^b Unité Mixte de Recherche INRA-ENSAR 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes' - INRA –Centre de recherches de Rennes - Domaine de La Motte- BP 35327- 35653 Le Rheu Cédex, France

*To whom correspondence should be addressed

✉Email: wicker@rennes.inra.fr

Running title : Pathogenicity of *Aphanomyces euteiches* isolates on Legumes

Keywords: epidemiology, Fabaceae, host specificity, Oomycota, pea common root rot, soilborne disease

ABSTRACT

Aphanomyces root rot (*Aphanomyces euteiches*) has become a very destructive disease in French pea crops since 1993. The host specificity of the French pea-infecting populations of this pathogen was investigated by inoculating pea, common vetch, alfalfa, broad bean and green bean with 91 pea-infecting *A.euteiches* isolates, originating from the main areas of infestation in France. These isolates were compared to 13 isolates from various countries and hosts (pea, green bean, alfalfa). Virulence phenotypes were defined according to the pathogenicity data on the different hosts: all isolates from France infected two to five legume species, with most infecting pea, vetch, alfalfa and broad bean. Four pathotypes were characterised within the French isolates: one type corresponded to broad-host range isolates, the second was composed of isolates preferentially aggressive on pea/vetch/alfalfa and weakly aggressive on broad bean, and two others corresponding to more specialised isolates that preferentially infected pea/vetch or pea/vetch/alfalfa. Most isolates from France were preferentially pathogenic on pea, like the pea-infecting isolates from other countries, but were less specialised than the alfalfa- and green bean-infecting isolates from other countries. These results suggest that *A. euteiches* isolates may be maintained on wild or cultivated legumes other than pea in France.

INTRODUCTION

Aphanomyces euteiches, a soilborne oomycete, was described in 1925 as the causal agent of a soft root rot that affected pea crops (*Pisum sativum*) in Wisconsin, USA (Jones & Drechsler, 1925). It was considered to be primarily a pea root pathogen (Scott, 1961). More recently, *A. euteiches* has been identified in many other regions of the Midwestern, Central and Northwestern States of the USA (Holub et al., 1991; Kraft & Boge, 1994); Canada (Basu et al., 1973), Europe (Persson et al., 1997), Australia (Allen et al., 1987), New Zealand (Manning & Menzies, 1980) and Asia (Yokosawa et al., 1974), causing heavy losses, primarily on pea crops.

Several authors also reported *A. euteiches* to be a pathogen of alfalfa (*Medicago sativa*) (Greenhalgh & Merriman, 1985), green bean (*Phaseolus vulgaris*) (Pfender & Hagedorn, 1982), broad bean (*Vicia faba*) (Lamari & Bernier, 1985) and clover (*Trifolium*

pratense (Tofte et al., 1992), *Trifolium subterraneum* (Burnett et al., 1994)). Many control measures have been tested (Papavizas & Ayers, 1974), but the only efficient way to control the disease identified to date is to avoid planting peas in contaminated fields and to ensure that there is an appropriate time interval between successive pea crops in the rotation (Carrouée et al., 1995).

Although it was first identified in France as early as 1933 (Labrousse, 1933), *A. euteiches* has caused major losses in pea crops only since 1993 (Didelot & Chaillet, 1995), probably due to the intensification of the spring pea crop from the 1980s, and climatic conditions very favourable to the disease (mild and wet springs). Initially affected areas were clustered and limited in extent (2 to 5 % of the total area under pea), in the Parisian Basin (Carrouée et al., 1995; Maufras et al., 1997), but the disease has since occurred in other regions (Brittany, Rhone-Alpes). To date however, *A.euteiches* has never been reported for any other crop, although many other legumes were cultivated in France before the expansion of the pea crop, and some are still cultivated in rotation with pea in some regions (e.g. pea-green bean rotations in Brittany and Picardy, pea-alfalfa rotations in Champagne).

This raises the question as to how this soilborne fungus, not expected to migrate over long distances (Papavizas & Ayers, 1974) (for example from the USA or even Scandinavia to France), developed epidemics so quickly in different parts of the country. *A. euteiches* can survive in the soil for up to 10 years (Papavizas & Ayers, 1974), in the form of oospores, which can withstand unfavourable conditions (e.g. dessication, freezing). It may also be maintained on one or several alternative hosts. Many species are infected by *A. euteiches* (Papavizas & Ayers, 1974), including weeds and pasture legumes that are colonised without symptoms (Chan & Close, 1987). However, these plants have not been clearly demonstrated to play a role in maintaining the fungus and renewing the inoculum.

Thus, several questions concerning the epidemiology of this disease in France remain unanswered. It is possible that there is a single population of *A. euteiches* which, although evident only on pea, has a much broader host range, and is harboured by various wild or cultivated legume species. Alternatively, there may be different subpopulations with different host specificities or host ranges, one of which has been favoured and selected by the recent shorter pea rotations.

Experimental evidence supporting this second hypothesis has been provided by the results of Malvick *et al.* (1998) in the Midwestern United States. Four genotypically and phenotypically different subpopulations were distinguished: 'alfalfa/red clover', 'alfalfa', 'green bean', 'non-pathogenic'. However, the differences between subpopulations were not large enough for them to be considered different *formae speciales*, (except for the 'green bean' subpopulation assimilated into f. sp. *phaseoli*). Moreover, the isolates pathogenic on pea (f. sp. *pisi* as defined by Pfender & Hagedorn (1982)) were not genotypically clustered together.

The existence of different subpopulations may have major consequences in soils with *A. euteiches*, in which growers are advised to replace pea by broad bean. To date, broad bean has displayed complete field resistance to the pathogen, but it may maintain a proportion of the *A. euteiches* population, or enable the pathogen to adapt to this new host.

The objectives of this work were: (i) to determine the degree of specialisation of the French populations of *A. euteiches*, (ii) to determine whether they are pathogenic on legume species other than pea and whether there are host preference groups and (iii) to compare these isolates with reference isolates from other countries.

MATERIALS AND METHODS

Aphanomyces euteiches isolates

One hundred and four isolates were tested in this study (Table 1.1). They were assigned to four groups: (I) ninety-one isolates from pea ('pea' isolates), from France ; (II) seven 'pea' isolates, from Canada, New-Zealand, Sweden and USA ; (III) two 'green bean' isolates from the USA and (IV) four 'alfalfa' isolates from the USA and Australia.

The ninety-one isolates from France were isolated from pea seedlings grown in soil samples taken from diseased fields in various regions of France. The bait cultivar used, Baccara, is a very susceptible variety, and the most widely grown spring pea variety in France. Six main zones of origin were defined: 'Eastern Parisian Basin' (EPB, 53 isolates), 'Western Parisian Basin' (WPB, 14 isolates), 'Brittany' (10 isolates), 'North' (6 isolates), 'Centre' (5 isolates) and 'South' (3 isolates).

'Pea' isolates from other countries were Ae109, Ae110, Ae172 (USA), Ae146 and Ae147 (Sweden), isolate Ae139 (New-Zealand) and a Canadian isolate (Ae163).

Two 'green bean' isolates, Ae111 and Ae112, and an 'alfalfa' isolate (Ae114) originated from the USA, while the other 'alfalfa' isolates were from Australia (Ae151, 154 and 158).

Baiting, isolation and culture conditions

Disinfected pea seeds (diluted sodium hydrochloride, 1% available Cl₂), placed on sterile filter paper, at the bottom of plastic cylindrical boxes, and covered with 2 cm soil were used as baits for *A. euteiches*. The soil was adjusted to 90% of the water-holding capacity, and boxes were closed and incubated 13 days at 25°C in darkness. Plants were then recovered, roots were washed under tap water and those displaying typical honey-brown soft symptoms of common root rot were used to isolate the pathogen.

Infected roots were disinfected in diluted sodium hydrochloride, rinsed in sterile distilled water, and dried on filter paper. Root pieces were then transferred to semi-selective medium (MBR) (Malvick et al., 1994), and incubated at 25°C. The first hyphal tips were recovered 2 to 3 days later, and subcultured on fresh MBR medium. After 3 to 4 days of incubation at 25°C, the isolates were identified as *A. euteiches*, according to the key of Scott (1961).

All cultures were maintained on cornmeal agar slants (CMA) (Difco, Detroit, MI), stored at 10°C, and subcultured every 6 months.

Pathogenicity tests

Host species

The degree of host specialisation of the 104 isolates was assessed by testing them on five legume species, chosen according to their prevalence in the infested areas of France: pea (*P.sativum*, cv. Baccara), common vetch (*V. sativa*, cv. Topaze), alfalfa (*M. sativa*, cv. Europe), broad bean (*V. faba*, line 8-8-2) and green bean (*P. vulgaris*, cv. Aramis).

Inoculum production and inoculation

Zoospores of *A. euteiches* were produced using a modified version of the Mitchell and Yang technique (cited by Parke & Grau, 1992): 20 agar discs (5 mm diameter) were

transferred from a 3- to 4-day-old culture on CMA plates to a 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of sterile peptone glucose (PG) broth (peptone: 20 g.L⁻¹, glucose: 5 g.L⁻¹), and incubated at 25°C for 3 days. The PG broth was then removed under sterile conditions, and the mycelial mats rinsed twice for 2 hours and once for 16 to 20 hours, with 30 ml sterilised VOLVIC® water (Sté des Eaux de Volvic, 63530 Volvic, France). Motile zoospores were counted with a Malassez haemocytometer, and the concentration adjusted to 5000 zoospores.mL⁻¹.

Plastic pots containing 250 mL of vermiculite (Vermex M, Bretagne Matériaux, 35570 L'Hermitage, France), were sown with four seeds of pea or vetch, three seeds of broad bean or green bean or 8 to 12 seeds of alfalfa. The vermiculite was moistened with tap water. Each isolate was inoculated on four trays, each tray containing one pot of each host. These four trays were treated as replicates.

Plants were grown in a growth chamber with a 16 h light : 8 h dark regime, with a temperature regime of 25°C and 23°C respectively (adaptation of the testing conditions of Malvick et al. (1998)).

When seedlings were 7 days old, 20 mL of zoospore suspension was dispensed on the vermiculite over the entire area of the pot, giving a final dose of 10⁵ zoospores per pot. The same quantity of water was dispensed on the uninoculated control. The vermiculite was then saturated with water to optimise infestation, and was watered as required over the following days to keep the substrate moist.

Ten days after inoculation, the plants were removed from the vermiculite and the disease index (DI) was assessed visually on each host according to the following 0-5 scale: (0) no symptoms; (1) discoloured traces on rootlets; (2) discoloured to honey-brown zones on rootlets and part of the tap root, covering at least ¼ of the root system; (3) honey-brown, soft zones covering at least ½ of the root system, epicotyl in some cases discoloured and water-soaked, but still firm; (4) most of the root system soft and honey-brown to dark brown, epicotyl soft and brown, shrivelled, first leaves yellowing; (5) plant dead.

The experiment was conducted in a randomised split-plot design with isolate as the main plot and host species as the subplot. The isolates Ae30, Ae36, Ae37, Ae84, Ae110, Ae112, Ae114, Ae144, Ae171, Ae172, were tested at least twice (Table 1). All gave similar results over the different experiments.

Analysis of host specificity

Differences in the mean value of DI on the various hosts were tested by analysis of variance (procedure SAS GLM), and means were compared by the Newman-Keuls test ($P=0.05$) (SAS, 1996), for each of the four groups of isolates (I, II, III and IV).

The relationship between aggressiveness on pea and aggressiveness on the other legume species was assessed by plotting the mean DI on pea against the mean DI values for the other four legume species, for the 105 isolates tested.

Correlation coefficients (r) were calculated for the relationship between DI values on pea and DI values on legume species, for the 99 'pea' isolates (groups I and II).

According to Malvick & Percich (1998), a plant was considered susceptible to *A. euteiches* if the organism was reisolated from the roots after inoculation, and/or if oospores were observed within the roots.

In a preliminary inoculation experiment, Ae84 (a 'pea' isolate from France, broad-host range) and Ae112 (a 'green bean' isolate from the USA, non-pathogenic on pea, very aggressive on green bean) were tested. On the basis of these experiments (data not presented) pathogenicity thresholds were set at $DI \geq 1$ for pea (P), alfalfa (A), broad bean (F) and vetch (V), and $DI \geq 2$ for green bean (B). These threshold values were used to indicate the degree of host range for each isolate tested, and define virulence phenotypes.

Definition of pathotypes

A multiple correspondence analysis (MCA) was used to characterise the French 'pea' isolates in terms of their overall effects on the five legume species. This MCA was followed by an ascending hierarchical classification (AHC), to define pathotypes.

Ninety-one individuals (isolates) and five variables (legume species) were considered and DI mean values were transformed into disease severity (DS) classes: class 1 : $DI < 1$; class 2: $1 \leq DI < 2$; class 3: $2 \leq DI < 3$; class 4: $3 \leq DI < 4$; class 5: $4 \leq DI < 5$; class 6: $DI = 5$. The data were analysed with SPAD 3.5 software (CISIA-CERESTA, 1998). A multiple correspondence analysis (proc CORMU) was carried out, which distinguished five active variables (legume species), associated with 19 active modalities (existing DS class among the legume species). Active modalities corresponding to less than two isolates were assigned at random to the other modalities.

Isolates were then grouped according to a hierarchical classification based on coordinates on the first ten factorial axes of the MCA (proc RECIP). The best partition according to the criterion of Ward (Lebart et al., 1984), based on the intercluster/total inertia ratio, was described (proc PARTI).

RESULTS

Disease severity and host range

For the French 'pea' isolates (Table 1.1, group I), the host plant most severely affected was pea (mean $DI = 4.33 \pm 0.98$), followed by vetch (3.23 ± 0.78), alfalfa (2.63 ± 0.97), broad bean (1.64 ± 1.00) and green bean (0.94 ± 0.75). The 'pea' isolates from other countries (Table 1, group II) displayed the same host ranking, regardless of origin: Europe, America or New Zealand.

Conversely, isolates from other legume species differed greatly in pathogenic behaviour. The 'green bean' isolates (Table 1.1, group III) preferentially attacked green bean (mean $DI = 3.93 \pm 0.01$), followed by vetch (2.36 ± 0.37), and symptoms were least severe on alfalfa, pea and broad bean (mean $DI = 1.79 \pm 0.16$, 1.21 ± 1.56 and 0.11 ± 0.16 , respectively).

The 'alfalfa' isolates (Group IV) also behaved differently (Table 1.1). Alfalfa and vetch were the most severely affected species (mean $DI = 3.35 \pm 0.24$ and 3.04 ± 0.17 , respectively), followed by green bean (2.07 ± 1.36), broad bean (1.66 ± 0.67). These isolates caused no symptoms on pea.

For 'pea' isolates from France and other countries (Table 1.1, groups I and II), there was a strong relationship between aggressiveness on pea and on vetch ($r=0.778$, $P<0.01$) and between aggressiveness on pea and on alfalfa ($r=0.761$, $P<0.01$). Conversely, the relationships between aggressiveness on pea and broad bean ($r=0.560$, $P<0.01$), and between aggressiveness on pea and on green bean were weaker ($r=0.469$, $P<0.01$). Some of the isolates that were highly aggressive on pea (DI 4 to 5) were very aggressive on broad bean and/or mildly aggressive on green bean whereas others were non-pathogenic, according to the pathogenicity thresholds established (Fig. 1.4).

The 'alfalfa' and 'green bean' isolates were easily distinguished. The four isolates of alfalfa from the USA and Australia were not pathogenic on pea, but were aggressive on all the other species (only Ae114 was non-pathogenic on green bean). Similarly, the American isolates from green bean were the most aggressive isolates on green bean (DI=4), but were non-pathogenic or moderately pathogenic on pea, and non-pathogenic on broad bean.

Ranking of isolates based on susceptibility of hosts

Most of the isolates studied here infected at least two legume species, as defined by the virulence phenotypes (Table 1.1). Two (Ae4 from EPB and Ae79 from Centre) of the 91 French isolates were non-pathogenic and 89 (98%) were pathogenic on pea and vetch (PV); 82 (90 %) were pathogenic on pea, vetch and alfalfa (PVA), whereas one was pathogenic on pea, vetch and broad bean (PVF); 59 (65%) were pathogenic on pea, vetch, alfalfa and broad bean (PVAF); nine isolates (10%) were pathogenic on all five species. So the French isolates comprised six PV, one PVF, 23 PVA, 50 PVAF and nine PVAFB isolates.

The seven 'pea' isolates from other countries were pathogenic on pea, vetch and alfalfa (PVA); four were pathogenic on pea, vetch, alfalfa and broad bean (PVAF) and two were pathogenic on all five legume species.

The isolates from other legumes formed four specific groups (PVAB, VAFB, VAB and VAF) that were not identified among 'pea' isolates. One of the 'green bean' isolates

(Ae111) was pathogenic on pea, vetch, alfalfa and green bean (PVAB), and the other (Ae112) was not pathogenic on pea but was pathogenic on vetch, alfalfa and green bean (VAB).

The 'alfalfa' isolates formed three groups of isolates non-pathogenic on pea: Ae114, from the USA, was pathogenic on vetch, alfalfa and broad bean (VAF); Ae154, from Australia, was pathogenic on vetch, alfalfa and green bean (VAB); Ae151 and Ae158, also from Australia, were pathogenic on vetch, alfalfa, broad bean and green bean (VAFB).

Thus, most of the 'pea' isolates were pathogenic on three, four or five legume species. The 'alfalfa' and 'green bean' isolates were more specialised, and were mostly non-pathogenic on pea.

Pathotypes

The French non-pathogenic isolates Ae4 (EPB) and Ae79 (Centre) were excluded from the multiple correspondence analysis.

Four pathotypes were generated by classification of the 89 isolates according to the MCA : A (9 isolates), B (64 isolates), C (13 isolates) and D (3 isolates) (Fig. 1.5 and Table 1.1).

The nine isolates of the pathotype A displayed the broadest host range, and were very aggressive on pea, moderately aggressive on vetch, alfalfa and broad bean. Some isolates were moderately aggressive on green bean whereas some were nonpathogenic on it.

The pathotype B, which comprised most of the isolates, had a similar aggressiveness on pea and vetch, but was weakly aggressive on broad bean, and non-pathogenic on green bean.

The pathotype C had the same host ranking than the pathotype B, with a lower aggressiveness on pea, vetch and alfalfa, and was non-pathogenic on broad bean and green bean. The pathotype D was only weakly aggressive on pea and vetch, and nonpathogenic on the other hosts.

'Pea' isolates from other countries were classified into the four types: Ae109 and 110 (USA) were pathotype A; Ae172 (USA), as well as Ae163 (Canada), were pathotype C. Ae146 (Sweden) was classified as pathotype B. Two isolates couldn't be classified within these types due to their specific aggressiveness patterns: Ae 147 (Sweden) and Ae139 (New-

Zealand) were highly aggressive on pea, and moderately aggressive on vetch and alfalfa, but nonpathogenic on broad bean and green bean.

DISCUSSION

In this study of the variability in the pathogenicity of *A. euteiches* isolates from France, pea isolates, although most strongly aggressive on their host of origin, were able to attack at least one other legume species with 65% infecting three other species (vetch, alfalfa and broad bean), and 10 % attacking all five legume species tested. Six virulence phenotypes were identified.

The 'pea' isolates from other countries (Sweden, USA, Canada, New Zealand) did not differ markedly from those from France, i.e. most infected four hosts, were most aggressive on pea and moderately aggressive on vetch and alfalfa. Conversely, the 'alfalfa' and 'green bean' isolates also infected three to four species, but not pea, and were generally only weakly aggressive on other species. These data, including investigations on pathogenicity on vetch and broad bean, support the results of previous American studies (Holub et al., 1991; Malvick et al., 1998) in which the pea-infecting isolates formed only two virulence phenotypes: 'pea' and 'pea/alfalfa'. They also confirm that the concept of a 'pea' specific virulence phenotype, (e.g. f. sp. *pisi*, as defined by Pfender and Hagedorn (1982)), is not appropriate for this pathosystem.

To assess the host specificity, we considered the pathogenicity as the capacity of a parasite to infect a host, and usually, to reproduce on it (Andrison, 1993; Malvick & Percich, 1998). Under our test conditions, *A.euteiches* could successfully infect and reproduce in the host roots when symptoms resulted in a $DI \geq 1$ on pea, vetch, alfalfa, broad bean, and 2 on green bean, hence the choice of pathogenicity thresholds lower than (2.5) as used by Malvick et al. (1998) and Shang et al. (2000). This difference in threshold, but with unaltered pathogenicity criteria, may have resulted from the experimental conditions (higher inoculum doses in our study, incubation conditions). However, the host specificity established with the four isolates (Ae109, Ae112, Ae114 and Ae172) tested on the same three legume species (pea, alfalfa, green bean) in the study of Malvick and in this study were very similar, except

for isolate Ae109, which was nonpathogenic on green bean in the former study, but pathogenic in this study. This difference may have been due to the use of different green bean cultivars.

Our results also showed that isolates displayed an important range of aggressiveness on several hosts, above the pathogenicity threshold. For this reason a complementary approach based on the definition of four pathotypes was used when assessing the aggressiveness of the isolate on each of the host plants. Using this approach, only 10% of the French isolates induced major disease symptoms on four legume species (pea, vetch, alfalfa, broad bean). Most isolates (70%) were very aggressive on pea, moderately aggressive on vetch and alfalfa, and weakly aggressive or non-pathogenic on broad bean and green bean. This approach allowed us to estimate that 8 % of the isolates of the virulence phenotype 'pea-vetch-alfalfa-broad bean' (PVAf) were moderately aggressive on broad bean (pathotype A) whereas all the others (pathotype B) were weakly aggressive on this species.

These results, obtained in controlled conditions, should be interpreted with caution. They showed that most of the French isolates could infect species other than pea to various degrees, whereas previously *A. euteiches* has only been described as a pathogen of pea in French fields. The finding that some isolates were aggressive on broad bean in the laboratory is also in apparent contradiction with the absence of field damage to this crop. Further experiments, including the inoculation of different broad bean varieties and plant species with oospores, temperature/aggressiveness assays, and studies of pathogen dynamics in the soil may help to explain apparent anomalies.

If the pea crop is replaced by other legume species, such as broad bean, in infested areas of France, there is a potential risk of selecting more aggressive isolates, or of the adaptation of isolates to this host, and new crop losses may occur in the near future, as it has been reported in England (Salt & Delaney, 1986).

Four of the five legume species tested could harbour 'pea' isolates and serve as alternative hosts. Common vetch appeared to be susceptible to most of the isolates, even the most specific ones (i.e. the 'green bean' isolates). This may indicate that vetch was the original host of *A. euteiches*. This legume species is found throughout France, especially in field margins. It may therefore be an universal host for *A. euteiches*, maintaining populations of this pathogen in the absence of pea. This should be tested using plants grown on several naturally infested soils, the inoculation of various vetch varieties, including those known to be

native in France, and studies of maintenance of the pathogen on vetch in the field. The role of other forage legume crops, such as clover, suggested by earlier studies (Holub et al., 1991; Malvick et al., 1998), wild legume species and weeds such as *Viola arvensis* and *Capsella bursa-pastoris* (Chan & Close, 1987) in the conservation of inoculum needs to be investigated.

The results of this study raise questions about this pathogen in France. The original *A. euteiches* population may have had a broad host range, and evolved to the specialisation on pea due to intense pea cropping. Conversely mixed legume rotations may favour the appearance of isolates with a broader host range, or make the population shift from preferential pathogenicity on pea to a higher level of aggressiveness on other species, like broad bean. Indeed, the two broad-host range isolates (Ae71 and Ae72) of the Centre region were isolated from a field with regular pea-broad bean rotations.

The resolution of these issues requires molecular characterisation of the French *A. euteiches* populations, to investigate whether this variability in pathogenicity is correlated with genotypic variability and the existence of genotypically different subpopulations. It would then be possible to study the genetic structure of the populations within and between fields subject to different cropping regimes and rotations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the following researchers for having kindly provided isolates: Prof. Craig Grau (University of Wisconsin-Madison, WI, USA) for the isolates Ae109, Ae110, Ae111, Ae112, Ae114, Ae172 (coded initially 467, IHP30, SZGB71, IHGB33, MW5 and P54 respectively); Dr. Lars Persson (Nestlé R&D Bjuv, Sweden) for the isolates Ae146 and Ae147 (coded LP U and LP 83); Dr. Julie Makie (University of Queensland, Australia) for the isolates Ae151, Ae154, Ae158 (initially coded UQ3679, UQ3682 and UQ3686); Dr. Luc Couture (Agriculture and Agri-food Canada) for the isolate Ae163 (SRSF0671); Dr. Maureen Fletcher (Landcare Research New Zealand Ltd) for the isolate Ae139 (ICMP12294). We also thank Marie-Laure Cazimajou and Sandrine Verger (Plant Protection Service, Fleury-les-

Aubrais, France) for having baited, isolated and provided some of the French *A.euteiches* isolates.

REFERENCES

- Allen RN, Letham DB, Akehurst AA, Say MM, 1987. Aphanomyces root rot of bean at Valla, New South Wales. *Australasian Plant Pathology* **16**, 82-4.
- Andrison D, 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence : the need for precision. *Phytopathology* **83**, 889-90.
- Basu PK, Brown-Crête R, Gourley CO, Haas JH, Harper FR, Lawrence CH, Seaman WL, Toms HNW, Wong SI, Zimmer RC, 1973. Prevalence and severity of diseases of processing peas in Canada, 1970-1971. *Canadian Plant Disease Survey* **53**, 49-57.
- Burnett VF, Coventry DR, Hirth JR, Greenhalgh FC, 1994. Subterranean clover decline in permanent pastures in north-eastern Victoria. *Plant and Soil* **164**, 231-41.
- Carrouée B, Verger S, Wicker E, Seguin B, 1995. Maladies du pois : enrayer l'extension d'Aphanomyces. *Perspectives agricoles* **207**, 55-9.
- Chan MKY, Close RC, 1987. Aphanomyces root rot of peas . Some pasture legumes and weeds as alternative hosts for *Aphanomyces euteiches*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **30**, 219-23.
- CISIA-CERESTA, ed. 1998. "SPAD version 3, Manuel de prise en main,". St Mandé.
- Didelot D, Chaillet I, 1995. Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In "2nd European Conference on Grain Legumes - Improving production and utilisation of grain legumes" (AEP, ed.), Copenhagen- Denmark.
- Greenhalgh FC, Merriman PR, 1985. *Aphanomyces euteiches*, a cause of root rot of subterranean clover in Victoria. *Australasian Plant Pathology* **14**, 34-7.

-
- Holub EB, Grau CR, Parke JL, 1991. Evaluation of the *forma specialis* concept in *Aphanomyces euteiches*. *Mycological Research* **95**, 147-57.
- Jones FR, Drechsler C, 1925. Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*. *Journal of Agricultural Research* **30**, 293-325.
- Kraft JM, Boge WL, 1994. Development of an antiserum to quantify *Aphanomyces euteiches* in resistant pea lines. *Plant Disease* **78**, 179-83.
- Labrousse F, 1933. Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* **19**, 71-84.
- Lamari L, Bernier CC, 1985. Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 139-45.
- Lebart L, Morineau A, Warwick KM, eds. ,1984. "Multivariate Descriptive Statistical Analysis", New York.
- Malvick DK, Grau CR, Percich JA, 1998. Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity test and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycological Research* **102**, 465-75.
- Malvick DK, Percich JA, 1998. Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from Central and Western United States. *Phytopathology* **88**, 915-21.
- Malvick DK, Percich JA, Pflieger FL, Givens J, Williams JL, 1994. Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Plant Disease* **78**, 361-5.
- Manning MA, Menzies SA, 1980. Root rot of peas in New Zealand caused by *Aphanomyces euteiches*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **23**, 263-5.

-
- Maufras J-Y, Wicker E, Sanssené J, 1997. Les maladies racinaires du pois (1) - *Aphanomyces euteiches*. *Perspectives agricoles* **226**, 68-75.
- Papavizas GC, Ayers WA, 1974. *Aphanomyces* species and their root diseases on pea and sugarbeet. *U.S. Department of Agricultural Research Technical Bulletin* **1485**.
- Parke JL, Grau CR, 1992. *Aphanomyces*. In “Methods on research on soilborne phytopathogenic fungi” (L. L. Singleton, J. D. Mihail and C. M. Rush, eds.). pp.27-30. APS Press, St Paul, Minnesota.
- Persson L, Bodker L, Larsson-Wilkström M, 1997. Prevalence and pathogenicity of foot and root rots of pea in Southern Scandinavia. *Plant Disease* **81**, 171-4.
- Pfender WF, Hagedorn DJ, 1982. *Aphanomyces euteiches* f. sp. *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology* **72**, 306-10.
- Salt GA, Delaney KD, 1986. Effect of previous legume crops on pea and bean root diseases. In “The pea crop” (P. D. Hebblethwaite, M. C. Heath and T. C. K. Dawkins, eds.). Butterworths, London, Boston, Durban.
- SAS, 1996. SAS/STAT User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Scott WW, 1961. A monograph of the genus *Aphanomyces*. Blacksburg, Virginia: Virginia Agricultural Experiment Station Technical Bulletin.
- Shang H, Grau CR, Peters RD, 2000. Evidence of gene flow between pea and bean pathotypes of *Aphanomyces euteiches*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **22**, 265-75.
- Tofte JE, Smith RR, Grau CR, 1992. Reaction of red clover to *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* **76**, 39-42.
- Yokosawa R, Kuninaga S, Teranaka M, 1974. [Note on pea root rot fungus, *Aphanomyces euteiches* Drechs. in Japan]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **40**, 454-7. (en Japonais)

PARTIE II : La variabilité de spécificité d'hôte chez *A.euteiches* se retrouve-t-elle à l'échelle parcellaire ?

1 INTRODUCTION

L'étude précédente a montré qu'à l'échelle régionale, malgré les limites de l'échantillonnage, il existe une variabilité parfois forte entre isolats d'*A. euteiches* issus de différentes parcelles d'une même exploitation, voire entre isolats d'une même parcelle (Annexe 2).

Il est intéressant de rappeler que cette variabilité a été mise en évidence, pour ce qui concerne la France, à partir d'isolats piégés uniquement sur pois, notamment parce que les dégâts d'*Aphanomyces* au champ n'ont été jusqu'ici observés que sur cette culture. La question reste cependant entière sur le statut de ces isolats : représentent-ils l'ensemble de la population pathogène d'*A.euteiches* dans les sols français, ou ne sont-ils que la « partie émergée de l'iceberg », fraction de population sélectionnée et favorisée par les fréquents retours en pois ? L'observation en 1992 de cas isolés d'*A. euteiches* sur haricot dans les Landes, en association avec *Rhizoctonia solani* (A.-S. Kouassi, UNILET, communication personnelle), irait dans le sens de cette seconde hypothèse.

L'examen de situations dans d'autres pays hébergeant ce pathogène conforte encore cette idée : ainsi en Australie, de fortes attaques ont été signalées sur haricot (Allen *et al.*, 1987), mais aussi sur luzerne et trèfle souterrain (*Trifolium subterraneum* L.) (Burnett *et al.*, 1994; Greenhalgh & Merriman, 1985; Othieno Abbo & Irwin, 1990). De même aux Etats-Unis, on trouve dans une même région des populations de spécificité d'hôte différentes, avec présence de phénotypes "pois" et phénotypes "luzerne" (Holub *et al.*, 1991). Par ailleurs, nous avons déjà vu que dans ce pays, des pathotypes (*sensu* Grau) " pois" et des pathotypes "haricot" peuvent coexister dans une même parcelle (Malvick *et al.*, 1998; Shang *et al.*, 2000).

Dans ce sous-chapitre, nous nous sommes donc intéressé plus précisément à la variabilité de spécificité d'hôte à l'échelle parcellaire. Nos objectifs étaient (i) de vérifier si des Légumineuses différentes étaient capables de piéger *A.euteiches* dans une même parcelle, puis d'analyser les profils de spécificité d'hôte des isolats ainsi obtenus ; (ii) de vérifier l'homogénéité de la population d'*A.euteiches* au sein d'une même parcelle, en fonction de la spécificité d'hôte.

Pour explorer le point (i), quatre espèces de Légumineuses ont été cultivées sur un sol naturellement infesté, en conditions semi-contrôlées, pour vérifier leur capacité à piéger l'agent pathogène. La spécificité d'hôte des isolats piégés a ensuite été analysée sur la gamme d'hôtes présentée dans l'étude précédente, en comparaison avec des isolats issus de lentille, et des isolats-référence étrangers. Le point (ii) a été abordé à partir d'une population d'isolats issus d'une culture de pois, sur une plateforme expérimentale située en Seine-et-Marne.

5 MATERIELS ET METHODES

5.1 *Origine des isolats d' A.euteiches*

5.1.1 Piégeage à l'aide de différentes Légumineuses

5.1.1.1 *En conditions semi-contrôlées : parcelle expérimentale de Cléguérec (56)*

Cette parcelle, site d'essai de l'UNILET (Union Nationale Interprofessionnelle des Légumes de Transformation), est située dans une zone de Bretagne où les cultures légumières, notamment le pois potager et le haricot, sont implantées depuis de nombreuses années. L'historique récent de cette parcelle est consigné dans le Tableau 1.2.

Le sol a été prélevé en Novembre 1996, après une culture de céréale, à raison de 3 x 30 prises de sol sur une profondeur de 0 à -20 cm environ. Après séchage à l'air libre, tamisage à 5 mm et homogénéisation, cet échantillon a été stocké en chambre froide (4°C, 60%RH) jusqu' à utilisation.

Pour le piégeage, effectué en Avril-Mai 1997, quatre espèces de Légumineuses ont été choisies : pois (cv. Baccara), luzerne (cv. Europe), féverole (lignée 8-8-2), haricot (cv. Aramis). Le sol est d'abord réparti en terrines de plastique (L x l x P internes : 44 x 29 x 7 cm), à raison de 4 cm d'épaisseur de terre. Dans chaque terrine, 50 graines de chaque plante-piège préalablement désinfectées (NaOCl 1.2%, 10 min) sont disposées à la surface du sol, puis recouvertes de 1 cm de vermiculite pour éviter le dessèchement superficiel. Les terrines sont ensuite arrosées, sans saturer le sol.

L'incubation a été effectuée ensuite sous tunnel (T° : $22 \pm 4^\circ\text{C}$). Au moment de la levée des plantes (4 à 6 jours après semis), les terrines ont été arrosées jusqu'à saturation, afin d'induire l'infection. Dans les jours suivants, les arrosages ont été prodigués en fonction des besoins.

Les arrachages de plantes ont commencé 10 jours après la saturation en eau du sol, puis tous les deux jours, suivant la méthode décrite par Holub *et al.*(1991). Quatre à cinq séquences d'arrachage ont été ainsi menées pour multiplier les chances de piéger *A.euteiches*.

Les symptômes racinaires ont été ensuite décrits visuellement, et les fragments racinaires touchés (5 à 10 par plante) utilisés pour isoler le champignon. Des observations microscopiques de racines (après coloration au Bleu Cotton et montage entre lame et lamelle) ont également été menées pour rechercher d'éventuelles oospores d'*A.euteiches* dans les tissus.

5.1.1.2 En conditions naturelles : parcelle expérimentale de Courtacon (77)

Des plants de lentille présentant des symptômes caractéristiques de pourriture racinaire à *Aphanomyces* (racines molles et de couleur brun-miel) ont été prélevés durant la même période, sur une plateforme d'essais ITCF (Institut Technique des Céréales et des Fourrages) située en Seine-et-Marne, au centre d'une région très touchée par le problème *Aphanomyces* sur pois. Trois isolats d'*A.euteiches* (Ae166, Ae167, Ae169) ont ainsi été retenus après purification selon le protocole décrit en 2.2.

5.1.2 Isolement à partir d'une culture de pois : plateforme expérimentale du Fretoy (77)

La pépinière d'essai du Groupement des Sélectionneurs de Pois protéagineux (GSP) située en Seine-et-Marne et d'une superficie de 2016 m², comptait 78 parcelles (26 parcelles par bloc, 3 blocs) emblavées avec le témoin sensible Solara (Figure 1.6). 10 plantes malades ont été prélevées en fin Mai 1998 dans chacune de ces parcelles.

Sur un grand nombre d'échantillons, les symptômes *Aphanomyces* étaient peu importants, parfois associés à des dégâts du complexe parasitaire de fin de cycle (*Fusarium solani*, *Phoma medicaginis* var *pinodella*, *F. oxysporum*).

Après isolement et purification des isolats comme décrit en 2.2, seuls 16 isolats d'*A.euteiches* (codés SOL), dont la localisation sur la parcelle est précisée Figure 1.6, ont pu être retenus pour notre étude.

5.2 Isolement, identification et entretien des isolats d' A.euteiches

Sur les racines des différentes Légumineuses testées montrant des symptômes bruns ou sombres, des fragments de tissus ont été prélevés, désinfectés (NaOCl 1.2%, 1 min.) puis rincés à l'eau stérile, séchés sur papier buvard stérile, et disposés sur milieu semi-sélectif MBR (Malvick *et al.*, 1994). Ces cultures ont été ensuite incubées à 25°C.

Deux à quatre jours plus tard, les filaments mycéliens émergeant des fragments racinaires ont été observés sous microscope. Seules les hyphes caractéristiques d'*Aphanomyces* ont été repiquées sur milieu MBR frais, et incubées à 25°C. Les isolats ont été ensuite identifiés comme *A. euteiches* d'après leur mode de sporulation dans l'eau de VOLVIC (sporange filamenteux avec un bouquet de kystes primaires à son embouchure) et la taille de leurs oogones et oospores (Scott, 1961).

Les isolats ont ensuite été conservés et entretenus comme décrit précédemment (Chapitre1- Partie I).

5.3 Spécificité d'hôte sur différentes Légumineuses

La spécificité d'hôte des isolats d'*A. euteiches* a été évaluée par inoculation sur pois, vesce commune, luzerne, féverole et haricot. Les conditions de croissance et d'incubation, ainsi que de notation des symptômes racinaires, sont celles décrites dans la partie 1 de ce chapitre.

Les isolats-référence Ae110 (USA, phénotype PVAFB), et Ae112 (USA, phénotype VAB) ont été inoculés dans les mêmes conditions.

Au vu de leurs caractéristiques de pathogénicité sur la gamme d'hôtes, les isolats ont été classés en phénotypes de virulence et pathotypes selon la méthodologie exposée dans la partie 1, en lien avec leur espèce-piège d'origine (parcelles de Cléguérec et de Courtacon), ou avec leur localisation dans la parcelle (plateforme du Frétoy).

6 RESULTATS

6.1 Capacité de différentes Légumineuses à piéger A.euteiches dans une même parcelle

Les 4 Légumineuses choisies se sont révélées capables de piéger *A.euteiches* dans le sol issu de la parcelle de Cléguérec (56). Les symptômes sur pois étaient typiques (nécrose molle brun-miel sur racines et hypocotyle); les symptômes sur luzerne étaient principalement localisés sur radicelles, puis sur le pivot ; sur haricot en revanche, seule la radicule paraissait touchée. Sur féverole, les symptômes étaient noirs et mous, en milieu et bout de radicelle (Figure 1.7).

Quinze isolats ont été ainsi piégés: trois sur féverole (BRE88, 89 et 90), quatre sur pois (BRE91 à BRE94), deux sur haricot (BRE95, BRE96) et six sur luzerne (BRE97 à BRE102).

6.2 Spécificité d'hôte d'isolats d' A.euteiches issus d'une même parcelle

6.2.1 En fonction de l'espèce-piège

Tous les isolats issus de la parcelle de Cléguérec attaquent le pois, la vesce, la luzerne et la féverole, indépendamment de la Légumineuse à partir de laquelle ils ont été piégés (Tableau 1.3). En revanche, aucun n'est pathogène sur haricot, même après piégeage sur cette espèce. Ils sont tous classés dans le phénotype de virulence PVAf.

Sur pois et vesce, les isolats présentent tous une grande homogénéité d'agressivité (IN moyens de 3.94 à 4.44 sur pois, 3.52 à 4.21 sur vesce). Sur luzerne, ils sont moyennement agressifs (IN de 2.52 à 3.50), seul BRE 93 (isolé de pois) provoque des symptômes moins importants. Sur féverole, deux des isolats les plus agressifs (BRE88 et BRE89) ont été piégés sur cette espèce.

La Figure 1.8 permet de visualiser le niveau d'agressivité des isolats suivant leur hôte d'origine, comparés à Ae112, isolat issu de haricot aux USA, et Ae110, isolat de pois préalablement caractérisé comme polyphage. Les isolats ont tous le même comportement sur pois et vesce, quel que soit leur hôte d'origine. La différence entre les isolats de haricot

BRE95 et BRE96 et la référence AE112 est particulièrement frappante : ces deux isolats sont très agressifs sur pois et non-pathogènes sur haricot, alors que la souche de référence est respectivement non pathogène et très agressive sur les mêmes hôtes. De même, les isolats issus de luzerne ne sont pas significativement plus agressifs sur leur hôte d'origine que les autres isolats. Seuls les isolats provenant de féverole semblent avoir une légère préférence pour leur hôte d'origine.

Les trois isolats issus de lentille sont très agressifs sur pois, moyennement agressifs sur vesce et luzerne, faiblement agressifs sur féverole. Sur haricot, seul Ae169 est pathogène (Tableau 1.3). D'après ces résultats, Ae166 et Ae167 sont classés dans le phénotype PVAF, tandis que Ae169 est classé dans le phénotype PVAFB. D'après leur profil d'agressivité sur les 5 espèces, ces trois isolats se classent dans le pathotype B.

6.2.2 En fonction de la localisation sur la parcelle

Les 16 isolats d' *A.euteiches* prélevés sur pois venant de la plateforme du Fretoy (77) sont tous pathogènes sur pois, vesce, luzerne, et féverole ; sur haricot, seul SOL75 est faiblement pathogène. SOL75 est donc le seul isolat PVAFB alors que tous les autres sont du phénotype de virulence PVAF (Tableau 1.4).

Sur pois, tous les isolats sont très agressifs (IN de 4.00 à 5.00). Sur vesce et luzerne, la variabilité observée est très faible : tous sont moyennement agressifs (IN de 2.75 à 3.69, et de 2.72 à 3.71 respectivement). Sur féverole, les différences sont plus marquées : SOL72 est moyennement agressif, et du même niveau que la référence Ae110 (IN de 3.21 et 3.08 respectivement), tandis qu' à l'opposé, SOL41, SOL65 et SOL78 sont très peu agressifs, du même niveau que Ae112.

De par leurs profils d'agressivité sur les 5 espèces, SOL72 est classé dans le pathotype A et les autres isolats dans le pathotype B.

Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre les différences de pouvoir pathogène sur Légumineuses et la localisation des isolats sur la pépinière (Figure 1.6).

7 DISCUSSION

D'après ces résultats, il existe bien en France des isolats d'*A.euteiches* capables d'infecter naturellement d'autres Légumineuses que le pois (en conditions favorables à l'expression de la maladie). Cependant, sur deux autres sols provenant de zones très infestées de l'Est du Bassin Parisien (dont l'un en rotation pois-féverole), les seuls isolats mis en évidence l'ont été sur pois (données non présentées). Il semble donc que le pois révèle bien toute la variabilité des populations d' *A.euteiches* présentes dans les sols français, même si le nombre de sols étudiés est trop faible pour être considéré comme représentatif de l'ensemble de la situation française.

D'autre part, il n'est pas observé ici de spécialisation préférentielle sur l'hôte d'origine : les isolats, qu'ils aient été piégés sur féverole, luzerne, haricot ou lentille, sont préférentiellement agressifs sur le pois, et secondairement la vesce, et souvent de même phénotype de virulence (PVAF dans l'immense majorité des cas). Par ces deux points, la situation française est très différente de la situation américaine. Les dernières études publiées (Grau *et al.*, 1991; Holub *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998) citent en effet de nombreux cas d'isolats pathogéniquement très différents piégés sur un même échantillon de sol, notamment des isolats de pathotypes "pois" et "haricot", coexistant dans une même parcelle et qui ont la possibilité de s'interféconder (Shang *et al.*, 2000). D'autre part, les isolats de luzerne des USA et du Canada sont préférentiellement pathogènes sur luzerne, et non pathogènes sur pois (Beghdadi *et al.*, 1992), de même que les isolats de trèfle par exemple (Malvick *et al.*, 1998). La situation française est également différente de celle observée au Royaume-Uni : à partir d'une parcelle à rotation féverole, un isolat très spécialisé sur féverole a été mis en évidence (Salt & Delaney, 1986).

Ces différences de situation sont sans doute révélatrices de différences d'historiques culturels, mais peut-être aussi de différences au niveau de la composition de la population parasitaire, celle de France paraît plus polyphage mais monomorphe et prioritairement pathogène sur pois, celle d'Amérique est plutôt divisée en sous-populations assez spécialisées sur leur hôte d'origine.

Par ailleurs la variabilité intraparcellaire de la spécificité d'hôte apparaît très ténue, et sans lien apparent avec la localisation des isolats sur la plateforme du Fretoy, contrairement à ce que pouvait laisser penser l'observation de plus fortes attaques dans la zone correspondant aux

isolats SOL39, SOL58 et SOL75, mais aussi contrairement aux observations de Malvick (1998) concernant une certaine zonation de virulence sur une parcelle du Minnesota.

La variabilité pathogène intraparcellaire d' *A.euteiches* apparaît en tout cas bien moindre que celle observée sur d'autres modèles, tels que *Magnaporthe grisea*, agent responsable de la pyriculariose du riz : 39 pathotypes ont ainsi été mis en évidence dans une même parcelle (Levy *et al.*, 1993). L'analyse moléculaire des populations d' *A. euteiches* présentes dans ces parcelles va nous permettre de vérifier si ces faibles différences correspondent à une structure de population particulière. L'étude de la variabilité intraparcellaire serait également intéressante à reprendre sur une parcelle présentant un ou plusieurs foyers particulièrement touchés, ce qui permettrait de vérifier si ces foyers sont des îlots constitués de clones plus agressifs, ou correspondent simplement à des zones où le potentiel infectieux du sol est plus élevé.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'étude de caractérisation de la spécificité d'hôte des populations françaises d' *A.euteiches* entreprise dans ce chapitre reposait sur deux alternatives :

- le pois est l'hôte préférentiel d'une population en fait polyphage,
- plusieurs sous-populations coexistent dans les sols français, et la culture intensive du pois a sélectionné l'une de ces sous-populations aux dépens des autres.

Dans la première partie de cette étude, il a été démontré que les isolats issus de pois possèdent une polyphagie potentielle plus ou moins étendue, et ce quelle que soit leur origine géographique (France ou autres continents). Parmi les isolats français, ont ainsi été mis en évidence des individus peu agressifs et spécialisés, mais surtout une majorité d'isolats agressifs sur pois, vesce et luzerne.

Dans la seconde partie, réalisée à l'échelle parcellaire, nous avons montré que plusieurs Légumineuses autres que le pois peuvent piéger *A.euteiches* dans des sols de culture français, en conditions naturelles (lentille) ou semi-contrôlées (luzerne, féverole et haricot), mais que les isolats ont tous un phénotype très proche, préférentiellement pathogène sur pois mais non spécialisé sur cette espèce.

Ces deux constats sont assez nouveaux en Europe continentale. Les rares études portant sur la spécialisation pathogène des populations européennes d'*A.euteiches*, en Hollande (Oyarzun *et al.*, 1993) et Danemark (Knudsen *et al.*, 2001), ont en effet montré l'absence d'attaque sur d'autres cultures que le pois, et surtout l'incapacité des isolats issus de pois à infecter la féverole et le haricot (Oyarzun *et al.*, 1993). Ces deux auteurs n'ont toutefois inoculé ni la vesce commune, ni la luzerne. D'autre part, leurs tests de pouvoir pathogène ont utilisé un inoculum à base d'oospores, et non de zoospores comme dans notre étude et dans les travaux américains. La spécificité d'hôte se joue-t-elle sur la germination des oospores, comme tendent à le montrer les résultats de Shang *et al.* (2000) ?

Nous avons par ailleurs constaté que les isolats issus de pois étaient aussi d'une agressivité moyenne à forte sur vesce et sur luzerne. L'agressivité sur pois est de plus corrélée à l'agressivité sur vesce et sur luzerne. En revanche, peu d'isolats se sont montrés pathogènes à la fois sur pois et sur haricot, et aucun n'est apparu très agressif sur les deux espèces. Ceci

amène à s'interroger sur l'existence d'une relation entre proximité taxonomique et sensibilité des hôtes, comme cela a été observé dans d'autres pathosystèmes.

Chez *Phytophthora megasperma* notamment, les relations taxonomiques entre les sous-espèces semblent être liées à la distance taxonomique entre leurs hôtes respectifs : les sous-espèces les plus proches sont spécifiques de la luzerne et du trèfle, alors que celle spécifique du soja est plus éloignée (Hansen, 1987). D'autres exemples de coévolution de champignons pathogènes et de leurs plantes hôtes ont été identifiés, comme certaines variétés de rouille (la Rouille du blé par exemple) et leurs hôtes chez les Graminées (Anikster & Wahl, 1979).

Dans notre étude, le pois et le haricot sont des membres assez distants dans la sous-famille des *Papilionoideae* (tribus des *Vicieae* pour le pois, des *Phaseoleae* pour le haricot), et ont des centres d'origine très éloignés (Asie Mineure et Amérique du Sud, respectivement). En revanche, pois et vesce appartiennent à la même tribu (*Vicieae*) et ont le même centre d'origine (Heywood, 1996). Des facteurs communs pourraient donc être impliqués dans la pathogénicité d' *A.euteiches* sur ces deux dernières espèces.

Cependant, les isolats des USA et d'Australie, issus de luzerne (*Vicieae*) et non-pathogènes sur pois, contredisent cette idée. Cette contradiction pourrait s'expliquer par les différences de rotations culturales entre France, USA et Australie. La luzerne est en effet cultivée beaucoup plus intensivement dans ces deux derniers pays, et depuis plus longtemps, ce qui peut être à l'origine d'une adaptation des populations pathogènes locales à cette espèce, comme le suggèrent Holub *et al.* (1991).

Nos résultats peuvent également paraître en contradiction avec certaines données émanant du terrain : plusieurs isolats de notre collection ont montré une agressivité modérée sur féverole par exemple, alors qu'aucun dégât au champ n'a jusqu'ici été signalé en France sur cette culture. Plusieurs hypothèses, là encore, seraient à considérer : on ne peut pas exclure que d'autres cultures soient attaquées en conditions naturelles, sans que le niveau de maladie soit aussi spectaculaire que sur pois, en raison du cycle cultural notamment. Les espèces hôtes pourraient également avoir un effet différentiel sur la multiplication du pathogène et/ou sur la germination de l'inoculum primaire. Alors que les Légumineuses fourragères auraient un pouvoir de multiplication plus faible que les Légumineuses à graines (Salt & Delaney, 1986), le pois en particulier semble avoir une forte capacité à accroître le potentiel infectieux du sol, si l'on en juge à travers l'importance des dégâts signalés dans des parcelles n'ayant plus porté de pois depuis 20 ans.

Ces différentes hypothèses seraient à confirmer, notamment par des inoculations comparatives d' *A. euteiches* par oospores et zoospores, des essais d'agressivité en différentes conditions environnementales (température, humidité), des essais variétaux (notamment dans le cas de la féverole), et des études de dynamique de la population pathogène dans le sol en présence de différentes Légumineuses.

Enfin, les résultats de cette caractérisation ont de fortes implications agronomiques, par les suggestions qu'ils apportent en terme de raisonnement des rotations pour empêcher la multiplication de l'agent pathogène, mais aussi amener à des stratégies de lutte culturale raisonnée.

L'élaboration d'une sélection variétale efficace et durable, autre volet de la lutte, doit être accompagnée par la caractérisation de la virulence et agressivité des populations françaises d'*A.euteiches* sur pois, qui va faire l'objet du prochain chapitre.

Cette étude de spécificité d'hôte a également permis d'aborder certains points de l'épidémiologie du champignon, qui vont être approfondis lors de la caractérisation moléculaire présentée dans le Chapitre 3.

Table 1.1 Isolates of *Aphanomyces euteiches* with code number, geographical origin, mean disease index values (DI) on pea, vetch, alfalfa, broad bean and green bean, virulence phenotype and pathotype

Group I: Isolates collected from pea, in France

Code	location ^b	Disease index (DI) values					Virulence	Pathotypes ^e
		pea	vetch	alfalfa	broad bean	green bean	phenotypes ^d	
Ae78	EPB	5,00	4,06	3,50	3,67	1,38	PVAF	A
Ae43	EPB	5,00	4,02	3,38	2,17	0,75	PVAF	B
Ae44	EPB	5,00	3,88	2,25	1,58	0,50	PVAF	B
Ae170	EPB	5,00	3,81	3,50	2,33	0,92	PVAF	B
Ae20	EPB	5,00	3,67	3,13	0,92	0,50	PVA	B
Ae21	EPB	5,00	3,63	3,21	0,67	1,50	PVA	B
Ae125	EPB	5,00	3,63	3,13	1,75	1,58	PVAF	B
Ae5	EPB	5,00	3,56	2,67	2,00	0,92	PVAF	B
Ae118	EPB	5,00	3,46	3,46	2,71	0,67	PVAF	B
Ae127	EPB	5,00	3,35	3,13	1,58	1,67	PVAF	B
Ae126	EPB	5,00	3,00	3,92	3,04	2,83	PVAFB	A
Ae124	EPB	5,00	2,81	3,17	1,04	1,17	PVAF	B
Ae115	EPB	4,94	3,79	2,88	1,92	0,17	PVAF	B
Ae168	EPB	4,94	3,58	3,38	2,42	1,83	PVAF	B
Ae117	EPB	4,88	4,02	3,25	2,13	0,33	PVAF	B
Ae6	EPB	4,88	3,94	2,08	0,38	0,00	PVA	B
Ae106	EPB	4,88	3,50	2,67	2,17	1,17	PVAF	B
Ae81	EPB	4,88	3,25	3,17	2,50	0,58	PVAF	B
Ae128	EPB	4,88	2,81	3,29	1,00	1,25	PVAF	B
Ae12	EPB	4,81	4,19	2,79	1,46	1,42	PVAF	B
Ae57	EPB	4,81	4,17	2,42	2,25	1,25	PVAF	B
Ae86	EPB	4,81	4,00	3,50	3,25	0,75	PVAF	A

Ae46	EPB	4,81	3,75	3,13	2,50	1,00	PVAF	B
Ae24	EPB	4,81	3,65	2,67	0,50	0,67	PVA	B
SOL49	EPB	4,81	3,00	2,21	2,17	0,42	PVAF	B
Ae1	EPB	4,75	3,63	2,79	2,25	0,42	PVAF	B
Ae116	EPB	4,75	2,94	2,92	1,25	2,00	PVAFB	B
Ae48	EPB	4,69	2,45	2,37	2,30	1,04	PVAF	B
Ae132	EPB	4,63	3,54	3,38	2,63	1,75	PVAF	B
Ae65	EPB	4,63	3,00	3,50	3,00	2,83	PVAFB	A
Ae85	EPB	4,56	3,08	1,29	0,42	1,33	PVA	B
Ae15	EPB	4,56	2,56	1,38	0,00	0,17	PVA	C
Ae63	EPB	4,50	3,19	3,04	1,83	0,75	PVA	B
Ae18	EPB	4,44	3,42	2,33	2,17	1,00	PVAF	B
Ae108	EPB	4,44	3,06	2,25	0,25	1,33	PVA	B
Ae19	EPB	4,38	3,88	2,79	0,75	1,33	PVA	B
Ae123	EPB	4,31	3,81	3,75	2,67	1,42	PVAF	B
Ae130	EPB	4,31	3,13	2,92	2,75	0,25	PVAF	B
Ae28	EPB	4,25	2,81	3,25	0,92	0,75	PVA	B
Ae55	EPB	4,21	3,29	3,04	1,96	0,83	PVAF	B
Ae103	EPB	4,19	3,00	3,22	2,50	1,67	PVAF	B
Ae131	EPB	4,00	3,81	3,67	2,63	0,42	PVAF	B
Ae8	EPB	3,75	2,50	0,83	0,42	0,08	PV	C
Ae2	EPB	3,42	3,31	1,46	0,08	0,00	PVA	C
Ae37 ^a	EPB	3,38	2,26	1,88	0,50	0,04	PVA	C
Ae105	EPB	3,23	3,00	2,21	1,25	0,58	PVAF	B
Ae16	EPB	3,19	2,81	1,71	0,17	0,00	PVA	C
Ae36 ^a	EPB	3,15	2,38	1,10	0,43	0,13	PVA	C
Ae23	EPB	3,06	2,13	1,71	0,75	0,00	PVA	C
Ae66	EPB	2,94	2,31	1,38	0,33	0,00	PVA	C
Ae45	EPB	2,13	2,92	0,63	0,50	0,00	PV	C
Ae25	EPB	1,69	1,19	0,13	0,08	0,17	PV	D
Ae4	EPB	0,08	0,08	0,17	0,11	0,44	NP	
Ae33	WPB	5,00	3,94	3,21	0,92	1,00	PVA	B

Ae120	WPB	5,00	3,88	3,13	2,46	1,92	PVAF	B
Ae70	WPB	5,00	3,81	3,54	2,71	2,63	PVAFB	B
Ae41	WPB	5,00	3,31	3,08	1,50	0,50	PVAF	B
Ae30 ^a	WPB	4,97	3,84	3,58	3,12	1,40	PVAF	A
Ae144 ^a	WPB	4,97	3,83	3,28	2,21	1,04	PVAF	B
Ae34	WPB	4,94	3,88	2,79	2,83	0,58	PVAF	B
Ae59	WPB	4,75	4,00	3,38	3,08	2,92	PVAFB	A
Ae60	WPB	4,60	4,08	2,98	2,17	2,29	PVAFB	B
Ae76	WPB	4,58	3,88	3,08	2,42	0,58	PVAF	B
Ae31	WPB	4,38	3,69	2,75	1,25	0,33	PVAF	B
Ae75	WPB	4,13	3,94	2,73	1,71	0,75	PVAF	B
Ae22 ^a	WPB	3,59	2,41	1,48	0,21	0,58	PVA	C
Ae10	WPB	2,88	2,13	0,46	1,00	0,33	PVF	C
Ae171 ^a	Brittany	5,00	3,56	3,63	2,27	1,21	PVAF	B
Ae53	Brittany	4,88	4,00	2,96	2,08	0,67	PVAF	B
Ae83	Brittany	4,88	2,88	2,21	0,21	0,25	PVA	B
Ae29	Brittany	4,81	3,33	2,75	2,75	0,50	PVAF	B
Ae52	Brittany	4,58	2,65	2,26	0,46	1,00	PVA	B
Ae82	Brittany	4,50	3,94	2,50	0,75	0,08	PVA	B

Table 1.1 (continued)

Code	location ^b	Disease index (DI) values					Virulence	Pathotypes ^e
		pea	vetch	alfalfa	broad bean	green bean	phenotypes ^d	
Ae7	Brittany	4,50	3,21	3,25	2,17	0,58	PVAF	B
Ae92	Brittany	4,31	3,40	2,75	2,71	0,83	PVAF	B
Ae51	Brittany	4,06	3,83	2,64	0,96	0,50	PVA	B
Ae54	Brittany	3,69	3,25	0,79	0,63	0,42	PV	C
Ae71	Centre	5,00	3,63	3,54	3,17	2,42	PVAFB	A
Ae50	Centre	5,00	3,33	3,54	2,50	2,08	PVAFB	B
Ae119	Centre	5,00	3,19	3,58	2,21	1,92	PVAF	B

Ae72	Centre	4,44	3,38	3,75	3,00	2,50	PVAFB	A			
Ae79	Centre	0,00	0,06	0,50	0,08	0,33	NP				
Ae27	North	5,00	3,38	2,92	2,00	1,67	PVAF	B			
Ae11	North	5,00	3,06	2,79	1,38	1,33	PVAF	B			
Ae47	North	4,94	3,35	3,66	1,58	0,58	PVAF	B			
Ae42	North	3,81	3,13	3,21	0,83	0,00	PVA	C			
Ae26	North	3,81	3,00	3,33	2,54	1,50	PVAF	B			
Ae49	North	3,19	1,00	0,13	0,00	0,00	PV	D			
Ae84 ^a	South	4,83	3,44	3,56	3,10	1,90	PVAF	A			
Ae40	South	4,19	3,00	2,75	1,58	0,75	PVAF	B			
Ae39	South	1,88	2,00	0,04	0,13	0,00	PV	D			
	Mean ^c	4,33	a	3,23	b	2,63	c	1,64	d	0,94	e
	SD	0,98		0,78		0,97		1,00		0,75	

Group II: Isolates collected from
pea, in other countries

		Disease index (DI) values					Virulence				
Code	Country	pea	vetch	alfalfa	broad bean	green bean	phenotypes ^d				
Ae109	USA	5,00	3,83	3,58	3,58	2,83	PVAFB				
Ae110 ^a	USA	4,87	3,05	3,66	3,06	2,81	PVAFB				
Ae172 ^a	USA	4,78	2,95	1,31	0,63	0,17	PVA				
Ae146	Sweden	4,94	4,02	3,43	2,25	1,00	PVAF				
Ae147	Sweden	4,50	3,23	2,25	0,75	0,67	PVA				
Ae139	New-Zealand	4,00	3,31	3,29	1,13	0,25	PVAF				
Ae163	Canada	3,19	2,94	2,16	0,79	0,50	PVA				
Mean ^c		4,30	a	3,29	b	2,69	c	1,74	d	1,05	e

SD	0,77	0,42	0,91	1,13	1,13
----	------	------	------	------	------

Group III: Isolates collected from green bean

		Disease index (DI) values								Virulence		
Code	Country	pea		vetch		alfalfa		broad bean		green bean		phenotypes ^d
Ae111	USA	2,31		2,63		1,90		0,00		3,92		PVAB
Ae112 ^a	USA	0,11		2,10		1,68		0,23		3,93		VAB
	Mean ^c	1,21	b	2,36	ab	1,79	ab	0,11	b	3,93	a	
	SD	1,56		0,37		0,16		0,16		0,01		

Group IV: Isolates collected from alfalfa

		Disease index (DI) values							Virulence		
Code	Country	pea	vetch	alfalfa	broad bean	green bean	phenotypes ^d				
Ae114 ^a	USA	0,00	3,17	3,41	1,90	0,05	VAF				
Ae158	Australia	0,00	3,13	3,42	2,08	2,58	VAFB				
Ae154	Australia	0,00	3,08	3,56	0,67	2,83	VAB				
Ae151	Australia	0,13	2,79	3,00	2,00	2,83	VAFB				
	Mean ^c	0,03	d	3,04	ab	3,35	ab	1,66	c	2,07	bc
	SD	0,06		0,17		0,24		0,67		1,36	
Control		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00					

^a isolates tested twice. The result is the mean of two experiments

^b The location is the region of origin of the isolate.

EPB comprises Seine-et-Marne, Aisne, Marne, Val de marne.

WPB comprises Eure, Eure-et-Loir, Loir-et-Cher, Seine-Maritime, Yvelines.

Brittany comprises the departments Finistère and Morbihan.

North comprises Somme and Oise.

Centre comprises Indre, Cher, Creuse, Côte d'Or.

South comprises Charente-Maritime and Pyrénées-Atlantiques.

^c The means labelled with the same letter (across rows) are not significantly different (Newman-Keuls test, $P=0.05$)

^d P= pathogenic on pea, V= pathogenic on vetch, A= pathogenic on alfalfa, F= pathogenic on broad bean,

B= pathogenic on green bean - See the text for details.

^e Four pathotypes, named A to D, were defined. See the text for details

Tableau 1.2 Historique cultural de la parcelle de Cléguérec (56)

Années	Cultures
1988-89	Pois
1989-90	Pomme de terre
1990-91	Céréales
1991-92	Epinards- Haricot
1992-93	Céréales
1993-94	Pois
1994-95	Pomme de terre
1995-96	Céréales

Tableau 1.3: Spécificité d'hôte d'isolats d'*A.euteiches* piégés sur différentes Légumineuses (sol de Cléguérec, et isolats de lentille de Courtacon)

<u>Cléguérec</u>	Hôte d'origine	Indice de nécrose ^a					Phénotype de Virulence
		pois	vesce	luzerne	féverole	haricot	
BRE 89	féverole	4,44 ± 0,27 <i>a</i> ^b	4,21 ± 0,54 <i>a</i>	3,50 ± 0,58 <i>a</i>	2,42 ± 0,50 <i>b</i>	1,58 ± 0,29 <i>c</i>	PVAF
BRE 95	haricot	4,31 ± 0,27 <i>a</i>	3,69 ± 0,38 <i>a</i>	3,25 ± 0,78 <i>a</i>	1,13 ± 0,18 <i>bc</i>	1,00 ± 0,00 <i>cde</i>	PVAF
BRE 98	luzerne	4,19 ± 0,27 <i>a</i>	3,75 ± 0,51 <i>a</i>	3,54 ± 0,72 <i>a</i>	2,25 ± 0,71 <i>b</i>	1,33 ± 0,43 <i>cde</i>	PVAF
BRE 101	luzerne	4,19 ± 0,27 <i>a</i>	3,75 ± 0,39 <i>a</i>	3,38 ± 0,64 <i>a</i>	1,50 ± 0,00 <i>bc</i>	1,08 ± 0,14 <i>cde</i>	PVAF
BRE 88	féverole	4,19 ± 0,13 <i>a</i>	3,58 ± 0,43 <i>a</i>	3,67 ± 0,29 <i>a</i>	2,00 ± 0,00 <i>b</i>	1,25 ± 0,29 <i>cde</i>	PVAF
BRE 100	luzerne	4,06 ± 0,13 <i>a</i>	3,81 ± 0,38 <i>a</i>	3,25 ± 0,67 <i>a</i>	1,71 ± 0,32 <i>bc</i>	1,00 ± 0,00 <i>cde</i>	PVAF
BRE 92	pois	4,06 ± 0,13 <i>a</i>	3,69 ± 0,33 <i>a</i>	3,47 ± 0,57 <i>a</i>	1,29 ± 0,47 <i>bc</i>	0,92 ± 0,14 <i>de</i>	PVAF
BRE 97	luzerne	4,06 ± 0,13 <i>a</i>	3,63 ± 0,43 <i>a</i>	3,21 ± 0,64 <i>a</i>	1,00 ± 0,00 <i>bc</i>	0,75 ± 0,29 <i>e</i>	PVAF
BRE 90	féverole	4,06 ± 0,13 <i>a</i>	3,56 ± 0,56 <i>a</i>	3,38 ± 0,71 <i>a</i>	1,50 ± 0,00 <i>bc</i>	1,17 ± 0,29 <i>cde</i>	PVAF
BRE 94	pois	4,06 ± 0,13 <i>a</i>	3,52 ± 0,27 <i>a</i>	3,18 ± 0,60 <i>a</i>	1,67 ± 0,58 <i>bc</i>	1,25 ± 0,29 <i>cde</i>	PVAF
BRE 91	pois	4,00 ± 0,00 <i>a</i>	4,10 ± 0,56 <i>a</i>	3,58 ± 0,59 <i>a</i>	2,38 ± 1,12 <i>b</i>	1,00 ± 0,00 <i>cde</i>	PVAF
BRE 96	haricot	4,00 ± 0,00 <i>a</i>	3,88 ± 0,25 <i>a</i>	3,58 ± 0,66 <i>a</i>	1,00 ± 0,00 <i>bc</i>	1,38 ± 0,47 <i>cde</i>	PVAF
BRE 102	luzerne	4,00 ± 0,00 <i>a</i>	3,56 ± 0,56 <i>a</i>	3,29 ± 0,88 <i>a</i>	1,63 ± 0,24 <i>bc</i>	2,00 ± 0,58 <i>b</i>	PVAF
BRE 93	pois	4,00 ± 0,00 <i>a</i>	3,56 ± 0,56 <i>a</i>	2,52 ± 0,97 <i>b</i>	1,54 ± 0,47 <i>bc</i>	1,42 ± 0,43 <i>cd</i>	PVAF
BRE 99	luzerne	3,94 ± 0,38 <i>a</i>	3,88 ± 0,55 <i>a</i>	3,11 ± 0,75 <i>a</i>	1,38 ± 0,18 <i>bc</i>	1,00 ± 0,29 <i>cde</i>	PVAF
USA							
Ae 110	pois	4,75 ± 0,25 <i>a</i>	3,06 ± 0,13 <i>b</i>	3,47 ± 0,57 <i>a</i>	3,08 ± 0,14 <i>a</i>	2,83 ± 0,29 <i>b</i>	PVAFB
Ae 112	haricot	0,44 ± 0,13 <i>b</i>	1,81 ± 0,24 <i>c</i>	1,46 ± 0,79 <i>c</i>	1,00 ± 0,00 <i>c</i>	4,00 ± 0,00 <i>a</i>	VAB
<u>Courtacon</u>	Hôte d'origine	Indice de nécrose ^a					Phénotype de Virulence
		pois	vesce	luzerne	féverole	haricot	
Ae169	lentille	5,00 ± 0,00	4,25 ± 0,87	3,62 ± 0,22	1,92 ± 0,27	2,08 ± 0,27	PVAFB
Ae166	lentille	5,00 ± 0,38	3,75 ± 0,28	3,75 ± 0,32	2,00 ± 0,17	1,00 ± 0,42	PVAF
Ae167	lentille	4,69 ± 0,00	3,69 ± 0,29	3,46 ± 0,33	1,92 ± 0,17	1,58 ± 0,32	PVAF

^a Les chiffres représentent l'indice nécrotique (IN) sur une échelle de 0 à 5 (moyenne de 4 répétitions suivie de l'écart-type).

^b Les moyennes suivies de la même lettre dans une même colonne ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($P=0.05$).

Tableau 1.4: Spécificité d'hôte des isolats d'*A.euteiches* isolés sur pois de la plateforme du Fretoy (77)

Code	Indice de nécrose ^a									Phénotype de Virulence	Pathotype						
	pois			vesce			luzerne		féverole			haricot					
SOL 42	5,00	± 0,00	<i>a</i> ^b	3,44	± 0,52	<i>ab</i>	3,48	± 0,79	<i>a</i>	2,25	± 0,00	<i>bcde</i>	1,83	± 0,14	<i>cd</i>	PVAF	B
SOL 72	5,00	± 0,00	<i>a</i>	3,19	± 0,13	<i>abc</i>	3,65	± 0,69	<i>a</i>	3,21	± 1,00	<i>a</i>	1,75	± 0,43	<i>cde</i>	PVAF	A
SOL 13	4,81	± 0,13	<i>ab</i>	3,06	± 0,13	<i>abc</i>	3,71	± 0,88	<i>a</i>	1,88	± 0,18	<i>cdef</i>	1,00	± 0,00	<i>ef</i>	PVAF	B
SOL 11	4,81	± 0,13	<i>ab</i>	2,75	± 0,20	<i>c</i>	3,21	± 0,70	<i>a</i>	1,33	± 0,43	<i>def</i>	1,00	± 0,00	<i>ef</i>	PVAF	B
SOL 24	4,75	± 0,00	<i>ab</i>	3,00	± 0,00	<i>bc</i>	3,63	± 0,54	<i>a</i>	2,38	± 1,04	<i>abcd</i>	1,25	± 0,00	<i>def</i>	PVAF	B
SOL 75	4,69	± 0,38	<i>ab</i>	3,31	± 0,27	<i>abc</i>	3,17	± 1,06	<i>a</i>	1,92	± 0,58	<i>cdef</i>	2,08	± 0,43	<i>c</i>	PVAFB	B
SOL 36	4,50	± 0,54	<i>ab</i>	3,27	± 0,62	<i>abc</i>	3,33	± 0,98	<i>a</i>	2,50	± 0,58	<i>abc</i>	1,67	± 0,58	<i>cde</i>	PVAF	B
SOL 39	4,44	± 0,13	<i>ab</i>	3,69	± 0,38	<i>a</i>	3,00	± 1,11	<i>a</i>	1,33	± 0,14	<i>def</i>	0,83	± 0,29	<i>f</i>	PVAF	B
SOL 58	4,38	± 0,14	<i>ab</i>	3,00	± 0,00	<i>bc</i>	3,66	± 0,44	<i>a</i>	1,21	± 0,32	<i>ef</i>	1,67	± 0,29	<i>cde</i>	PVAF	B
SOL 62	4,38	± 0,14	<i>ab</i>	3,00	± 0,00	<i>bc</i>	3,33	± 0,94	<i>a</i>	2,00	± 0,68	<i>cde</i>	1,33	± 0,29	<i>def</i>	PVAF	B
SOL 41	4,38	± 0,25	<i>ab</i>	3,00	± 0,25	<i>bc</i>	3,21	± 1,14	<i>a</i>	1,00	± 0,00	<i>f</i>	1,33	± 0,39	<i>def</i>	PVAF	B
SOL 79	4,31	± 0,38	<i>ab</i>	3,25	± 0,25	<i>abc</i>	3,35	± 0,83	<i>a</i>	1,42	± 0,14	<i>def</i>	1,25	± 0,29	<i>def</i>	PVAF	B
SOL 60	4,31	± 0,41	<i>ab</i>	3,25	± 0,29	<i>abc</i>	3,29	± 0,65	<i>a</i>	1,79	± 0,32	<i>cdef</i>	1,17	± 0,14	<i>def</i>	PVAF	B
SOL 65	4,31	± 0,13	<i>ab</i>	3,00	± 0,00	<i>bc</i>	2,72	± 1,05	<i>a</i>	1,08	± 0,14	<i>f</i>	1,00	± 0,00	<i>ef</i>	PVAF	B
SOL 78	4,19	± 0,27	<i>ab</i>	3,06	± 0,13	<i>abc</i>	3,29	± 0,97	<i>a</i>	1,08	± 0,14	<i>f</i>	1,58	± 0,29	<i>cdef</i>	PVAF	B
SOL 49	4,00	± 0,00	<i>b</i>	3,06	± 0,13	<i>abc</i>	3,08	± 0,83	<i>a</i>	1,63	± 0,18	<i>cdef</i>	0,83	± 0,29	<i>f</i>	PVAF	B
Ae 110	4,75	± 0,25	<i>ab</i>	3,06	± 0,13	<i>abc</i>	3,47	± 0,57	<i>a</i>	3,08	± 0,14	<i>ab</i>	2,83	± 0,29	<i>b</i>	PVAFB	A
Ae 112	0,44	± 0,13	<i>c</i>	1,81	± 0,24	<i>d</i>	1,46	± 0,79	<i>b</i>	1,00	± 0,00	<i>f</i>	4,00	± 0,00	<i>a</i>	VAB	

^a Les chiffres représentent l'indice nécrotique (IN) sur une échelle de 0 à 5 (moyenne de 4 répétitions suivie de l'écart-type).

^b Les moyennes suivies de la même lettre dans une même colonne ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($P=0.05$).

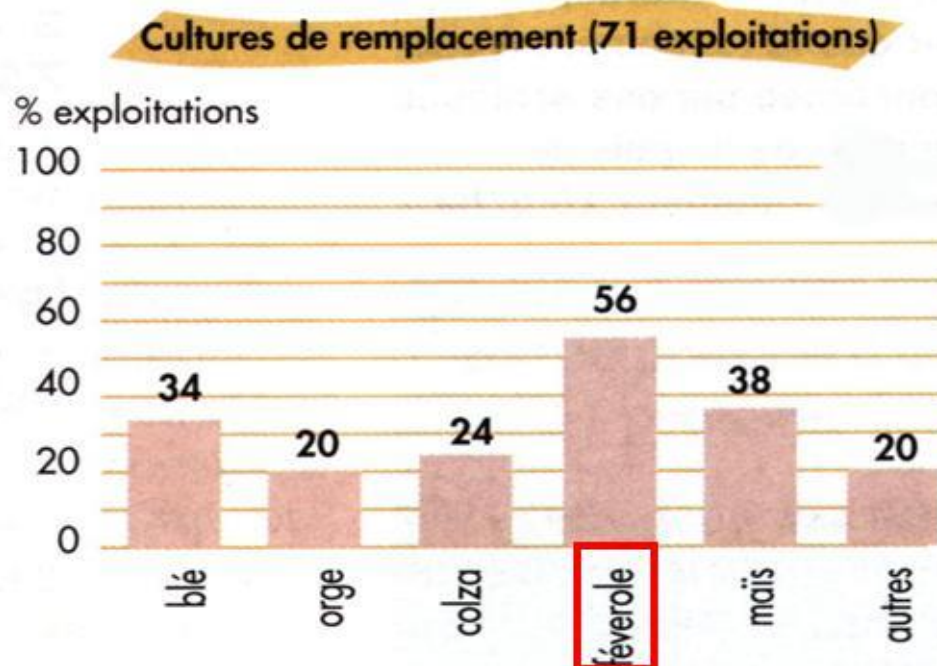
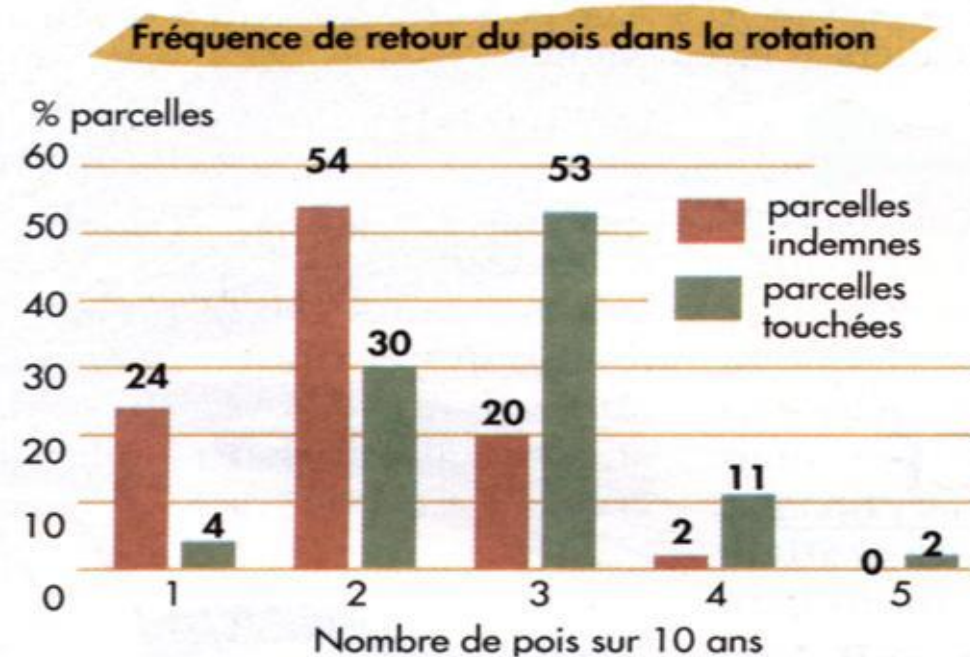


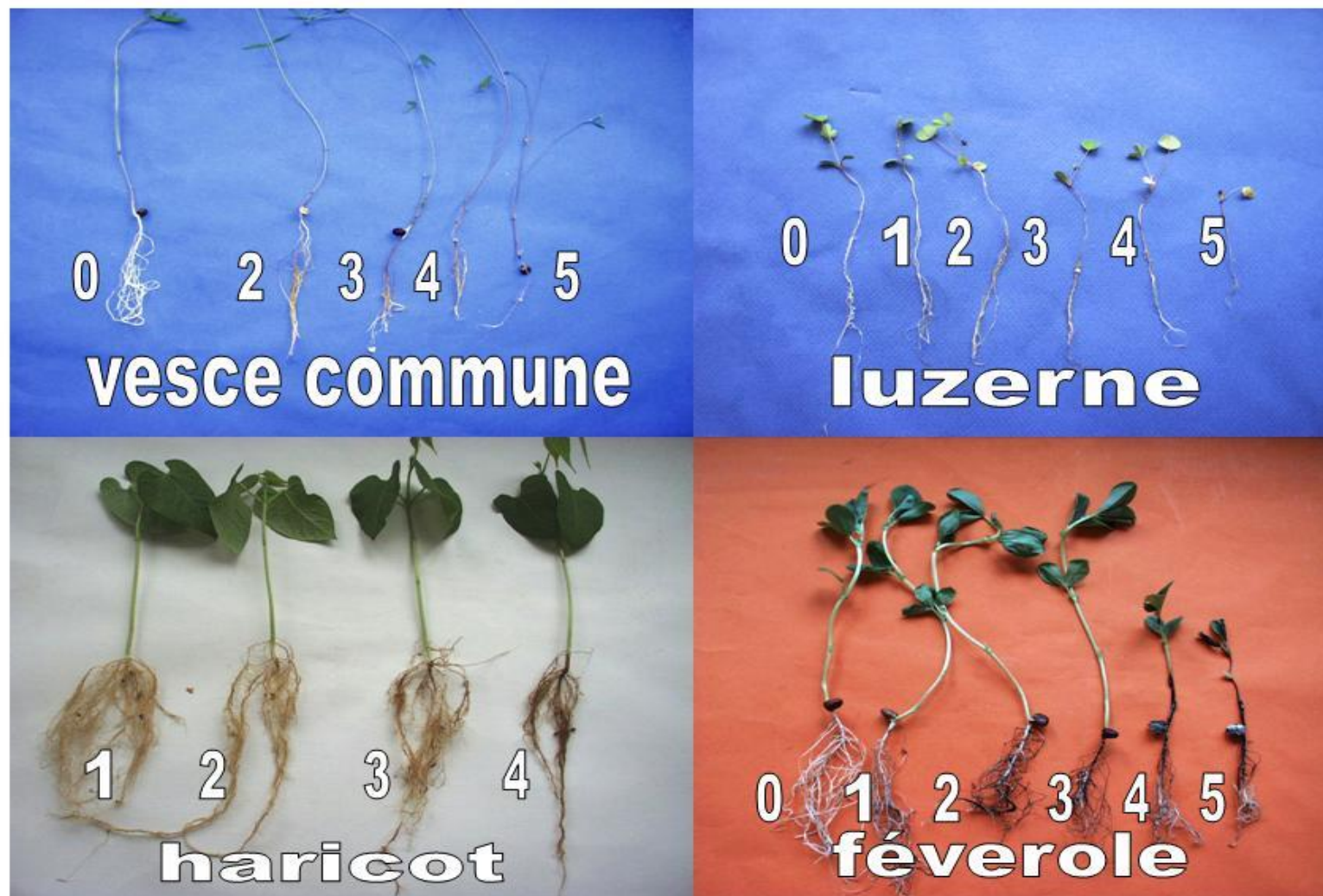
Figure 1.1 Fréquence de retour du pois dans les parcelles indemnes et infestées par *A.euteiches* -cultures de remplacement envisagées

Résultats d'enquête réalisée en Seine-et-Marne en 1997 (Dunoyer *et al.*, 1998)

Figure 1.2 Echelle de notation sur pois



Figure 1.3 Notation des symptômes dus à *A. euteiches* sur Légumineuses



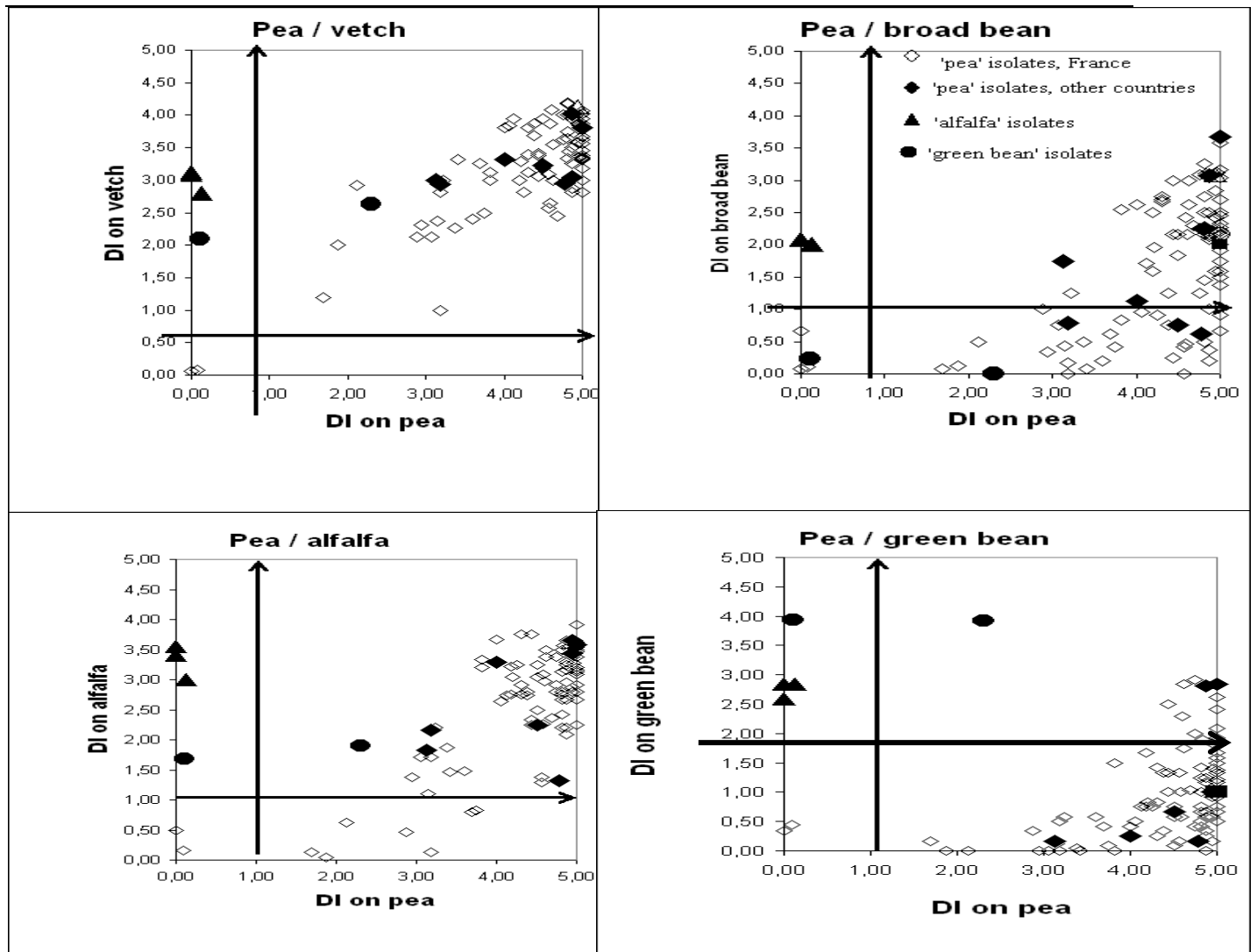


Figure 1.4 Relationship between the mean disease index (DI) on pea and the mean DI values on the four other legume species, after inoculation with the 104 *A. euteiches* isolates. The vertical and horizontal arrows correspond to the 'infection threshold' assessed on pea and the other legumes, respectively.

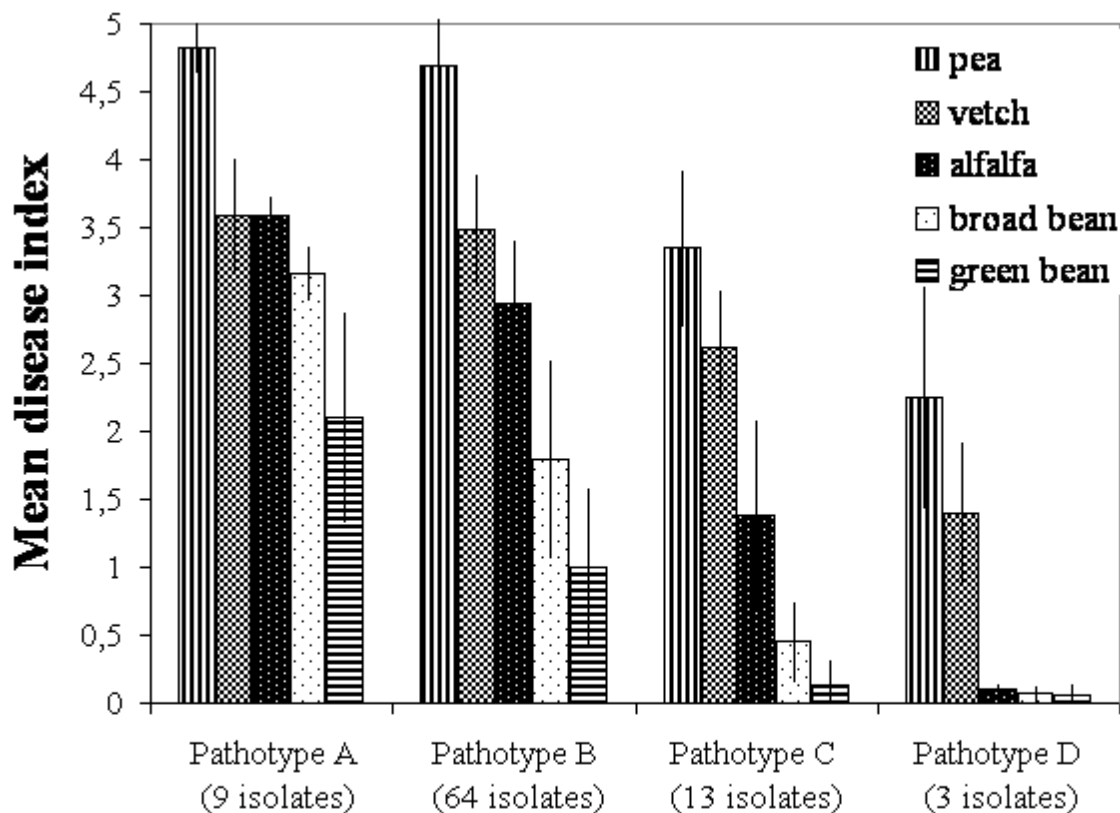
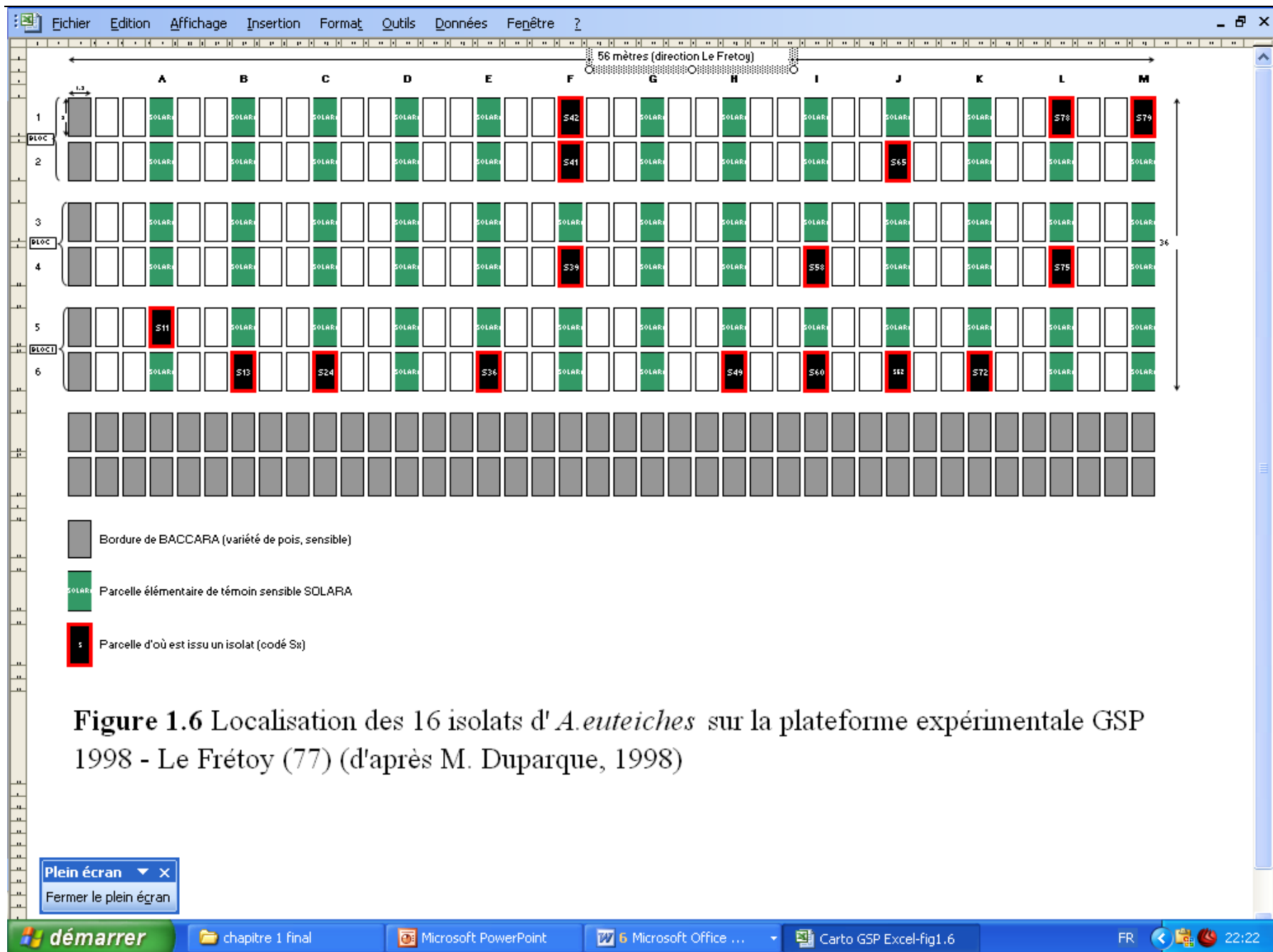


Figure 1.5 Pathogenic characteristics of the four pathotypes defined by the classification method within the 89 French 'pea' isolates. Isolates are considered nonpathogenic on pea, vetch, alfalfa and broad bean if their mean DI values <1.0 , but nonpathogenic to green beans at mean DI <2.0 . Bars indicate the standard deviation.



Luzerne



Féverole



Haricot

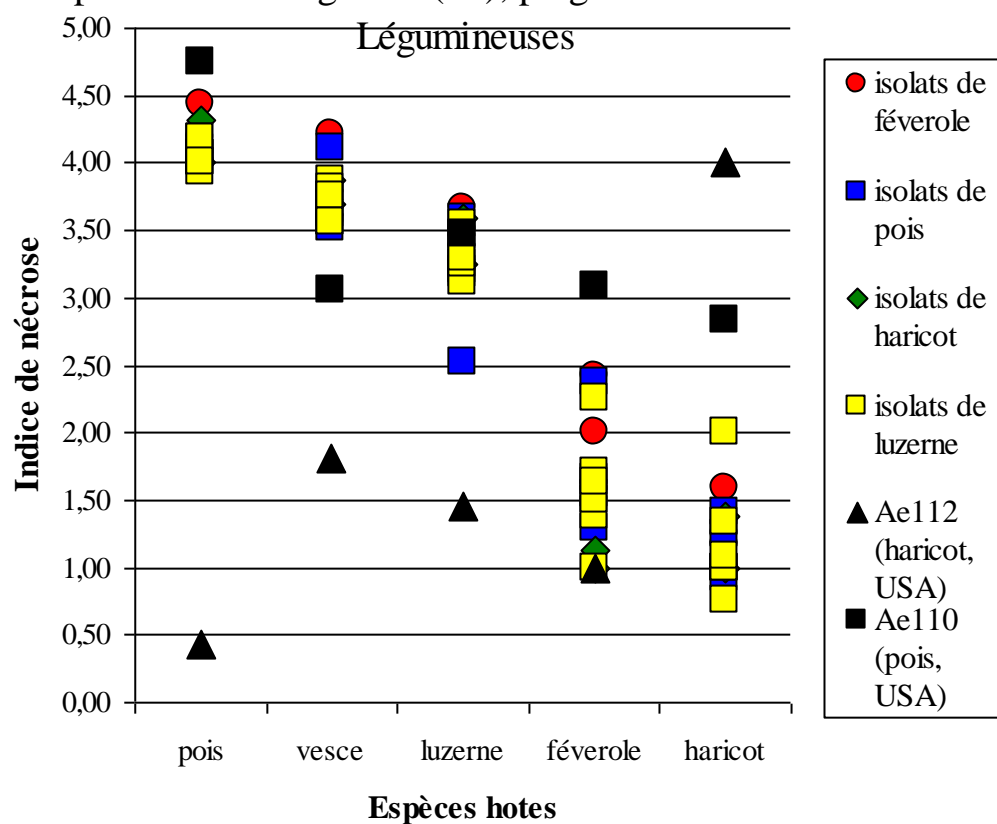


Pois



Figure 1.7: Symptômes provoqués par *A. euteiches* sur les espèces - pièges

Figure 1.8 Pouvoir pathogène sur pois, vesce, luzerne, féverole et haricot des isolats issus de la parcelle de Cléguérec (56), piégés sur différentes



Chapitre 2 : Virulence et agressivité sur pois des populations françaises d'*Aphanomyces euteiches*

Chapitre 2 : Virulence et agressivité sur pois des populations françaises d' *Aphanomyces euteiches*

INTRODUCTION

Notre synthèse bibliographique a montré que la lutte génétique apparaîtrait comme la piste la plus prometteuse pour résoudre le problème *Aphanomyces*. Les premiers essais de criblage de génotypes de pois résistants en France ont commencé en 1995, peu après la manifestation de la maladie, sous l'impulsion du GSP. Or les sources de résistance américaines, considérées comme les plus intéressantes, ont montré un comportement décevant lors de ces expérimentations. Ces différences de performances entre pays peuvent être dues à des conditions environnementales moins favorables aux lignées américaines dans les essais français. Mais l'hypothèse la plus vraisemblable est qu'il existerait de part et d'autre de l'Océan Atlantique des populations pathogènes très différentes en terme de virulence et agressivité sur pois.

L'interaction *A.euteiches* /pois a fait l'objet d'études relativement peu nombreuses (Synthèse bibliographique, p.23-24), assez disparates et superficielles, particulièrement en comparaison aux études menées sur d'autres pathosystèmes telluriques caractérisés par des phénomènes de résistance partielle, tels que le couple *Plasmodiophora brassicae* / Crucifères (Crute, 1986). Parmi les limites de ces études, quatre méritent d'être soulignées :

- Les sources de résistance ont été évaluées parfois par des méthodes différentes selon les sélectionneurs (Synthèse bibliographique, p.16 à 20), sans connaissance approfondie de l'origine et du déterminisme génétique de la résistance.
- D'autre part, aucune réflexion approfondie n'a été menée sur le ou les critères d'évaluation de la résistance à cet agent pathogène.

Rappelons qu'il est important de distinguer la résistance à l'agent pathogène, et la résistance à la maladie. La résistance à l'agent pathogène s'oppose à la progression du champignon dans les tissus de l'hôte, et a donc un impact sur l'épidémiologie de la maladie, la multiplication de l'inoculum fongique. C'est ce type de résistance qui permet d'une part de caractériser la

variabilité des populations pathogènes, et d'autre part de caractériser l'interaction en elle-même (voire d'approcher son déterminisme génétique).

La résistance à la maladie permet à l'hôte de résister aux effets indésirables de la maladie, et se rapproche beaucoup plus du concept de tolérance (Crute, 1986). Or c'est ce dernier type de résistance que les différentes études ont estimé:

- la moindre mortalité de plantes est un phénomène où se confondent résistance à l'invasion, mais aussi tolérance à la maladie, et une forte interaction environnementale. Le critère appliqué par Beute & Lockwood (1967) (Synthèse bibliographique, p. 23) était donc en fait assez arbitraire.
- le rapport de poids frais ou poids sec "inoculé/non inoculé" confond également effets de résistance et de tolérance, de façon similaire au critère "taille des galles" chez *Plasmodiophora brassicae* (Crute, 1986).

Seul l'indice de nécrose racinaire utilisé par Malvick & Percich (1998, 1999), se référant à la progression du pathogène dans les tissus de l'hôte, peut être assimilé à un critère de résistance à l'agent pathogène lui-même.

- Aucune donnée précise n'existe chez le pathosystème *A.euteiches*/pois pour différencier une interaction compatible (où le pathogène est capable d'infecter l'hôte et de s'y reproduire (Andrivon, 1993)) d'une interaction incompatible. A titre de comparaison, l'interaction incompatible dans le pathosystème *Phytophthora clandestina* / trèfle souterrain est caractérisée par une absence de développement fongique au delà de 4 mm du point d'inoculation, alors qu'en interaction compatible, le champignon est retrouvé à plus d'un cm de ce point (Purwantara *et al.*, 1998).
- Par ailleurs, aucune recherche du caractère différentiel ou non-différentiel de l'interaction n'a été menée, par analyse statistique notamment, que ce soit sur symptômes racinaires, ou sur les différentes composantes de la résistance caractérisées par Kraft & Boge (1996).

Pour étudier la virulence et l'agressivité d'*A.euteiches* sur pois, il nous a donc fallu d'abord mettre au point une nouvelle gamme différentielle, pour ensuite caractériser notre collection d'isolats français et d'isolats originaires de différents pays et continents touchés par cette maladie. Aucune comparaison n'avait été entreprise à cette échelle jusqu'ici.

PARTIE I : Mise au point d'une gamme différentielle de pois

Cette partie a fait l'objet d'un article soumis le 16 Janvier 2001 à **European Journal of Plant Pathology** : "Setting up of a differential set of pea cultivars to investigate the virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates", dont le texte intégral est présenté ci-après.

Problématique

Très succinctement, cette mise au point visait à répondre à quatre objectifs ayant pour ambition de nous doter des outils de caractérisation de notre collection, tout en apportant un nouvel éclairage sur certains points soulevés dans l' introduction de ce chapitre :

- choisir des génotypes de bon niveau de résistance, en tenant compte de leur généalogie lorsqu'elle était disponible (Synthèse bibliographique, p. 18-20),
- choisir un critère de résistance à l'agent pathogène lui-même,
- choisir un critère objectif différenciant une interaction compatible d'une interaction incompatible,
- étudier le caractère différentiel de l'interaction, afin de ne retenir dans la gamme que les génotypes les plus discriminants.

Démarche

- Notre démarche a consisté d'abord à évaluer en conditions contrôlées la résistance au stade jeune plante des lignées de pois jugées les plus intéressantes lors des criblages très larges effectués par l'équipe de Malvick, à l'Université du Minnesota (Malvick & Percich, 1996, 1999). Deux essais préliminaires en chambre climatique, particulièrement sélectifs, nous ont permis d'opérer un premier tri, et de montrer (i) que les pois potagers et les pois protéagineux ne différaient globalement pas en niveau de sensibilité, et (ii) que les variétés de pois protéagineux de type "hiver" ne présentaient pas de résistance intrinsèque supérieure aux variétés de type "printemps", contrairement à l'idée souvent avancée sur le terrain.

Les 33 génotypes retenus de niveaux de résistance plus ou moins élevés (Table 2.1), et déjà caractérisés aux USA pour certains, ont été inoculés par les zoospores de 2 isolats français d'*A.euteiches*, Ae5 et Ae44 (Table 2.2). La résistance des lignées a été estimée selon un indice de nécrose (IN), et le rapport de poids frais aérien inoculé/non inoculé (%PF).

Cette première phase a fait apparaître que les différentes lignées américaines (sélectionnées par ET Gritton, JM Kraft ou DW Davis) ou sauvages étaient plus résistantes que les variétés européennes, bien qu'aucune résistance totale n'ait été mise en évidence (Table 2.3).

- De ce criblage ont été retenues 13 lignées de pois, de bon comportement de résistance et de fonds génétiques aussi diversifiés que possible, en tenant compte notamment des généalogies des différentes lignées (Synthèse bibliographique, pp 18-20, Figures S.8 à S.10). Sur cette pré-gamme a été menée ensuite une première approche de l'interaction isolat x génotype, par confrontation à 8 isolats français d' *A.euteiches* et 6 isolats étrangers (Table 2.2).

La résistance à l'agent pathogène n'étant bien représentée que par l'indice de nécrose (IN), c'est ce dernier critère que nous avons conservé pour la suite des travaux.

Le critère de virulence/avirulence a été fixé à $IN=1$, après que l'on ait démontré que le champignon était végétativement actif (car isolable sur milieu gélosé sélectif) et capable d'accomplir sa reproduction sexuée (oospores repérables dans les racines) sur des symptômes notés $IN \geq 1$.

Principaux résultats

L'analyse de variance a montré que les effets génotype et isolat contribuent beaucoup plus que l'interaction souche x génotype à la variance totale. Les différences entre génotypes et entre isolats sont prépondérants, tandis que les effets différentiels, bien que hautement significatifs ($P < 0.01$), sont faibles (Table 2.4).

Les 13 génotypes de la pré-gamme ne présentent pas le même comportement vis-a-vis des 8 isolats français testés et des 6 isolats étrangers. La lignée la plus résistante aux isolats français est PI180693, alors que contre les isolats étrangers, ce sont MN313 et MN314 qui sont les plus résistants (Table 2.5).

Cinq "profils de résistance" ont été caractérisés (Table 2.6), ce qui nous a conduit à choisir une gamme différentielle finale de **six génotypes : Baccara (témoin sensible), Capella, MN313, 90-2131, 552, PI180693 (Figure 2.2).**

La culture de ces six génotypes sur une parcelle naturellement infestée par *A.euteiches* en 1999 et 2000 (collaboration avec Martine Duparque, GSP) nous a permis de vérifier que la résistance au stade « jeune plante » dans les conditions du test est corrélée au comportement des plantes adultes au champ (Figure 2.1 et Table 2.7).

Setting up of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum* L.) to investigate the virulence of *Aphanomyces euteiches* Drechs. isolates

E.WICKER^{1,2,a}, A.MOUSSART^{1,2}, M.DUPARQUE³, F.ROUXEL²

¹ Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en Protéines (UNIP) – 12, Avenue Georges V – 75008 PARIS – France

² Unité Mixte de Recherche INRA-ENSAR 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes' - INRA –Centre de recherches de Rennes - Domaine de La Motte- BP 35327- 35653 LE RHEU Cédex-France

³ Groupement des Sélectionneurs de Pois protéagineux – Domaine de Brunehaut – 80200 ESTREE-MONS - France

^a Corresponding author

Phone: (+33) 2 23 48 58 11

Fax: (+33) 2 23 48 51 80

e-mail: wicker@rennes.inra.fr

Keywords : Oomycota, Leguminosae, resistance, virulence, pea common root rot, soilborne disease

ABSTRACT

Common root rot (*Aphanomyces euteiches* Drechs.) has become a very destructive disease in the French pea crops since 1993. For an accurate investigation of the virulence variability within the French *A.euteiches* populations and between French and foreign populations, a new set of differential pea genotypes had to be developed. Thirty-three American and European pea lines, displaying resistance to a varying extent, were first screened in growth chamber in front of two French isolates. Root symptoms (giving a disease index) and percent of top fresh weight (inoculated/uninoculated top fresh weight ratio) were rated. From this screening were identified twelve resistant lines, from various genetic backgrounds, and a susceptible control. This pre-set of thirteen genotypes was confronted under controlled conditions with 14 isolates from France and other countries in the world, with the aim of investigating genotype-isolate interactions. Root symptoms were rated (disease index), and a susceptibility/resistance threshold was established at disease index=1. Five "resistance patterns" were identified, leading to a set of six pea genotypes : BACCARA (susceptible), CAPELLA, MN313, 902131, 552 and PI180693. Fields trials of this set in 1999 and 2000 gave the same resistance rankings than in growth chamber conditions. This set will allow to investigate more accurately the variability in virulence / aggressiveness of a large collection of *A.euteiches* isolates from France and foreign countries.

INTRODUCTION

Aphanomyces euteiches Drechs., a soilborne oomycete pathogen, has been first described in Wisconsin (Jones and Drechsler, 1925) as the causing agent of the common root rot of pea. It has been reported since in North America, Europe, Japan, New Zealand (Yokosawa *et al.*, 1974; Manning and Menzies, 1980; Hagedorn, 1984; Persson *et al.*, 1997), becoming the major factor reducing pea production throughout the world.

In the absence of efficient control methods (Papavizas and Ayers, 1974), except the avoidance of cropping pea in the diseased fields, the most promising way of controlling the disease has been the breeding and development of resistant varieties.

The efficiency and durability of a resistance breeding strategy relies on both the availability of a germplasm with a good level of resistance, and the knowledge of the variability of the pathogen.

A great breeding effort has been done in the USA since the 1960's (Lockwood, 1960; Lockwood and Ballard, 1960), and many lines, displaying partial resistance, have been released by the public breeders (Davis *et al.*, 1976; King *et al.*, 1981; Kraft, 1981; Kraft, 1989; Gritton, 1992; Kraft, 1992; Gritton, 1995; Davis *et al.*, 1995). Moreover an extensive evaluation program has been conducted within the Pullman Plant Introduction collection to identify new potential sources of resistance (Malvick and Percich, 1996; Malvick and Percich, 1999). In Sweden, some resistant lines were also reported (Engqvist, 1992), including Capella which is the only tolerant commercial variety known (registered by Svalov AB in 1990).

In France, pea crops have considerably increased since the beginning of the 1980's. However, the extension of this crop has been limited in the last few years by the recent development of *Aphanomyces* root rot, which has caused major crop losses, mainly in the most productive regions of the Parisian Basin (Didelot and Chaillet, 1995). The evaluation under French field conditions of some of the best American resistant pea lines gave mixed results. This contrast may be due to the use of different resistance evaluation methodologies, but should be most likely related to the differences of aggressiveness or virulence that may exist between the French and American populations of the pathogen.

The pathogenic variability of *Aphanomyces euteiches* has been only studied in the United States (Beute and Lockwood, 1967; Malvick and Percich, 1998a), in Sweden (Sundheim, 1972) and New-Zealand (Manning and Menzies, 1984), using sets of differential pea lines as descriptors. However, the resistance of these differential lines was not genetically characterised, and no global study was made to evaluate and characterise the overall variability of the fungus, on an international scale. No data exist about the pathogenic variability of the fungus in France, and we lacked useful tools to describe it. Preliminary resistance tests showed indeed that the lines of the most recent differential set (Malvick and Percich, 1998a) could not distinguish groups within some French strains.

The main objective of this study was thus to set up a set of differential pea lines that would be most accurate to assess the pathogenic variability within the French isolates, and between French and foreign isolates. A three-step procedure was followed :

- a screening of many wild accessions as well as breeders' lines allowed to identify material from different genetic backgrounds and of good level of resistance to the French strains; from this screening test, a group of thirteen lines, called pre-set, was constituted, with the aim of finding differential genotype-isolate interactions, although the genetic determinism of the resistance remains unknown;
- The pre-set was then confronted to two groups of *A. euteiches* isolates, one from France only, and the other from all over the world.
- From this confrontation, different resistance patterns could be found, which allowed to choose the most accurate lines to constitute an adequate pea set.

The second objective was to compare the seedling resistance displayed by this set in controlled conditions to its behaviour at a more developed stage, in natural field conditions.

MATERIAL AND METHODS

Pisum sativum genotypes

Thirty-three pea lines/varieties were evaluated in this study (Table 2.1). The pea breeding lines were chosen according to their geographical and breeding origin, and their degree of resistance or tolerance. Some were dry pea varieties registered in France and Sweden, and others, known to have a certain degree of resistance, were released by US public breeders :

J.M. Kraft (USDA-ARS Prosser), E.T. Gritton (University of Wisconsin- Madison), D.W. Davis (University of Minnesota-St Paul). Some of these breeder's lines (especially those of Gritton and Kraft) were already sorted as partially resistant from preliminary field trials in 1995 and 1997. Among the Plant Introductions (PI) from the USDA pea germplasm collection of Pullman, some were chosen among the best accessions according to the studies of Malvick and Percich (1996; 1999). More details on these pea accessions are available in the U.S.D.A. Germplasm Resources Information Network (http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/desc_form.pl?177).

***Aphanomyces euteiches* isolates**

The 14 *Aphanomyces euteiches* isolates tested in this study were isolated from France and foreign countries (Table 2.2), and were all pathogenic on pea. The French isolates were isolated from soil by baiting with pea seedlings (*Pisum sativum* L., cv. Baccara) according to the method described previously (Wicker *et al*, 2001), except Ae169 which was baited on lentil (*Lens culinaris* L.) from a naturally diseased field. The foreign isolates, kindly provided by researchers, were all baited on pea except Ae173, baited on green bean. These isolates were characterised as *A. euteiches* according to the key of Scott (1961), maintained on corn meal agar (CMA) (Difco, Detroit, MI) slants at 10°C, and transferred every six months on fresh CMA slants.

Screening of pea germplasm

The 33 pea lines were inoculated with two French isolates of *A. euteiches* : Ae5 and Ae44.

- **Testing conditions**

Zoospores of *A.euteiches* were produced as previously described (Wicker *et al*, 2001). Motile zoospores were counted with a Malassez hemacytometer, and the inoculum concentration was adjusted to 200 zoospores.ml⁻¹.

Each line was tested on three treatments: inoculated with either of the two isolates, and uninoculated. Each treatment consisted of a tray with five randomized plastic pots containing

250 ml of vermiculite (VERMEX M, Bretagne Matériaux, 35570 L'Hermitage, France). These five pots were considered as replicates. Four pea seeds were sown per pot, and the vermiculite was dampened with tap water. Plants were grown in a growth chamber with a 16h light : 8h dark regime, with a temperature regime of 25°C and 23°C respectively.

Seven days-old seedlings were inoculated by dispensing 20 ml of a zoospore suspension on the vermiculite over the entire area of the pot, for a total of 10^3 zoospores per plant. The same quantity of water was dispensed on the uninoculated control. Vermiculite was then saturated with water to optimise infestation, and was watered as required over the following days to keep the substrate moist.

- **Resistance assessment**

Seven days after inoculation, the plants were removed from vermiculite and disease index (DI) was assessed visually according to a 0-5 scale (Wicker *et al*, 2001). Plants were cut just above the cotyledonary insertion zone, and the fresh weight of the plant aerial parts was recorded. The plants of each pot were counted and bulked before being weighted. The fresh weight of a pot was considered as the fresh weight of four plants.

Percent of Fresh Weight (PFW) of a line was calculated as : $(\text{Fresh weight of the inoculated treatment} / \text{Fresh weight of the uninoculated treatment})^{-1} * 100$, based on equal numbers of inoculated and uninoculated plants.

Genotype effects on DI and PFW values were analysed for variance (ANOVA) and means were compared with the Newman-Keuls test ($P=0.05$), using the GLM procedure of the software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Reaction of the pre-set of P.sativum lines to French and foreign A. euteiches isolates

- **Pea genotypes and *A.euteiches* isolates**

From the 33 pea lines tested, 13 were selected to constitute a « pre-set » of differential pea genotypes (Baccara, Capella, 902131, 552, MN313, MN314, Melrose, PI180693, PI210641,

PI210642, PI244162, PI393487, PI413696), which was confronted to two groups of *A.euteiches* isolates.

The first group was constituted of seven isolates from all over the world, displaying a lot of variability according to geographical origins : Europe (Ae5 and Ae147), Canada (Ae163 and Ae164), the USA (Ae172 and Ae173) and New-Zealand (Ae139).

The second group was constituted of eight French isolates (Ae5, Ae6, Ae33, Ae40, Ae78, Ae83, Ae84, Ae169), chosen according to their degree of host specificity on 5 legume species (Wicker *et al*, 2001), and to their diverse geographical origins (Table 2.2).

- **Testing conditions**

The experimental design, method and dose of inoculation, incubation conditions were as previously described, except that there was no uninoculated control for each pea genotype.

- **Pathogenicity assessment**

In this step, the host-pathogen interaction was described by the disease index (DI).

The genotype, isolate and genotype x isolate interaction effects on DI were analysed for variance (ANOVA) as described above. The overall level of resistance displayed by each of the 13 lines to the two groups of isolates was compared and analysed for variance by the same procedure.

Moreover, a pathogenicity threshold was used to establish "resistance patterns" within this pre-set. According to Malvick *et al.* (1998), a plant should be considered susceptible to *A. euteiches* if the fungus can be reisolated from the roots after inoculation, and/or if oospores are observed within the roots. Preliminary experiments (Wicker *et al*, 2001) showed us that fungal isolation and oospore observations were possible if the root symptoms resulted in a DI of 1 or higher. Therefore, we fixed this pathogenicity threshold at DI=1 : if the mean DI is equal or superior to 1, the plant is considered susceptible ; if it is below 1, the plant is considered resistant. "Virulence types" were also established by this set within the isolates tested.

Comparison between the seedling and field reaction of the set of six pea genotypes

The seedling reaction in growth chamber of the six genotypes retained in the final set was compared to their resistance behaviour in natural conditions. For that purpose, the genotype rankings of the range in controlled and natural conditions were compared, and correlation analyses were made between the resistance variables in growth chamber and in the field.

- **Reaction in growth chamber**

The six genotypes of the final set were inoculated nine times with Ae5, incubated and rated (disease index) under the conditions described above. The results between dates were not significantly different ($P=0.05$). The DI data considered for correlation analysis were the mean results of the six lines over the nine experiments.

- **Field testing conditions in 1999 and 2000**

The six pea genotypes of the final range were evaluated for resistance in a naturally infested field at Courtacon (France).

Peas were sown on April 1st in 1999 and March 23rd in 2000 on a two-row plot size of 2.50 meter in a complete block design with three replicates.

On both years, the disease severity was evaluated by two indices. A root disease index (RDI) was rated on 12 plants per plot at the 5-6 leaves stage according to a 0-5 scale, where 0 = healthy root and 5 = completely rotted root (Wicker *et al*, 2001). Ratings were made 41 days after sowing in 1999, and 49 days after sowing in 2000.

An aerial index (AI) evaluating the stunting and yellowing symptoms of the plant aerial parts was recorded for each plot taken as a whole, on a 1-9 scale, with 1= healthy plants and 9 = dead plants (Duparque and Devaux-Boitel, 2001). In 1999, AI was measured at the beginning of flowering (AI1, 56 days after sowing) and during the seed set period (AI2, 69 days after sowing). In 2000, ratings occurred for AI1 at the beginning of the seed set period (75 days after sowing) and for AI2 at the end of the seed set period (84 days after sowing).

- **Data analysis**

The genotype effects on mean DI results in growth chamber, and on RDI and AI1 and AI2 results in field trials, were analysed for variance (ANOVA) and means were compared as described above.

Pearson correlation coefficients were calculated between the mean DI results provoked by Ae5 on the pea set in growth chamber, and the RDI and aerial indices at the first (AI1) and second date (AI2) observed in the field in 1999 and 2000, using the PROC CORR of the SAS software (SAS Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS

Screening of pea germplasm

After seven days of incubation, the genotype effect on disease ratings was significant ($P=0.05$), but no complete resistant genotypes could be found (Table 2.3), and the variation appeared to be continuous, from moderate to high susceptibility.

Ae5 was clearly more aggressive than Ae44, causing a higher DI and a lower PFW. The rankings of pea lines from susceptible to resistant were correlated between isolates, for DI ($r=0.64$, $P<0.01$) and for PFW ($r=0.62$, $P<0.01$).

- **Resistance behaviour considering the disease index (DI)**

DI values ranged from 4.53 to 2.75 with Ae5, and from 4.4 to 2.0 with Ae44.

With Ae5, the most susceptible lines were the European varieties (Baccara, Solara and Effekt) ; the breeding lines were intermediate ; three lines from ET Gritton (200, 560 and 552) and one from JM Kraft (902131), as well as some Pullman lines displayed the best behaviour.

With Ae44 also, the European varieties (particularly Baccara, Solara and Agat) were the most affected. Most of the lines, including the Kraft material, displayed an intermediate resistance; the most resistant lines were from Pullman, as well as 552 and MN314.

Confronted with both isolates, Baccara, Solara and the Belarus lines were the most susceptible material. PI180693, PI343984, PI244162 and 552 were among the most resistant

lines. Some lines like MN313, MN314, and PI413696 were resistant to Ae44 but intermediate with Ae5 ; no line was found very resistant to one isolate and susceptible to the other.

- **Resistance behaviour considering the percent of top fresh weight (PFW)**

PFW values were ranked from 42.01% to 93.23% with Ae5, 49.29% to 105.07% with Ae44.

With Ae5, the most susceptible lines were Baccara, Solara and PI 272212. Among the best lines, were Melrose, PI180693, MN313, WI9416 and 90-2322.

With Ae44, Baccara, Solara and PI272212 were also the most susceptible. The most resistant lines were PI180693, PI393487, Mistral and Melrose.

So Melrose and PI180693 were the most resistant lines to both isolates. Mistral and PI393487, as well as 560, were resistant to Ae44 but intermediate with Ae5. No line was resistant to one isolate and susceptible to the other.

The two resistance criteria were significantly correlated, for Ae5 ($r = -0.589$, $P < 0.01$) as well as for Ae44 ($r = -0.697$, $P < 0.01$). However some lines, although attacked by the fungus and having an intermediate DI, could stand the disease better than others, keeping a top biomass close to that of the uninoculated control. For example, MN314, showing with Ae5 the same DI as PI272212, had a significantly higher PFW than this line.

For the constitution of the pre-set, we chose the most resistant lines, with the care of keeping a genetic background variability. Thus, the best line from independant breeding programs was selected : 902131 from JM Kraft, 552 from E.T. Gritton, MN313 and MN314 from D.W. Davis, Capella from Svalof (although its behaviour was intermediate). Baccara was kept as a susceptible control. PI180693 was the best line according to DI and PFW with both isolates, and Melrose was among the best lines for DI and the second best for PFW. PI244162 was among the best lines for DI to both isolates. PI210641 and PI210642, despite intermediate regarding DI, were among the best lines for PFW ; they were also reported by Malvick and Percich (1999) as resistant to the 5 isolates they tested. For both criteria, PI413696 and PI393487 were intermediate with Ae5, but among the best lines with Ae44. These 13 lines constituted the pre-set.

Reaction of the pre-set of P.sativum lines to French and foreign A.euteiches isolates

- **Analysis of variance**

Genotype, isolate and genotype x isolate interaction effects on the DI were highly significant ($P < 0.01$). However, the contribution to the global variance of the interaction (represented by the mean square) was much lower than the contributions of the genotype and isolate effects (Table 2.4). Thus, differences between isolates and between genotypes were predominant, whereas the differential effects, although significant, were relatively weak.

- **Resistance variability**

The 13 genotypes behaved differently in front of the two groups of isolates (Table 2.5). In both groups, Baccara was the most susceptible variety, globally more attacked by the French group than by the World group. PI180693 was the most resistant line. MN313, MN314 and Melrose were more resistant to the World group than to the French group. Conversely, 552 was the second best line with the French group, but not with the World group.

- **Resistance patterns observed and choice of the differential genotypes**

The 13 genotypes of the pre-set, when confronted to the 14 isolates from France and foreign countries displayed six distinct patterns (Table 2.6) : Baccara, susceptible to all isolates; Capella, PI210641, PI210642 and PI413696 resistant to Ae164 ; 902131, PI244162, PI393487, Melrose resistant to Ae163 and Ae164 ; MN313 and MN314 resistant to Ae139, Ae173 and Ae164 ; 552 resistant to Ae139 and Ae164 ; and PI180693 resistant to Ae6, Ae78, Ae163 and Ae164.

Thus the final pea set was constituted of a genotype from each of the patterns : Baccara, Capella, 902131, MN313, 552, PI180693.

- **Virulence types**

On the 6 pea genotypes-set, six virulence types were distinguished (Table 2.6). Type I, rassembling six French and one Swedish isolates, was virulent to all genotypes. The type II, represented by two French isolates, was avirulent on PI180693. The types III, IV, V and VI were represented each by a single foreign isolate.

Comparison between the seedling and field reaction of the set of six pea genotypes

The six genotypes displayed the same resistance ranking in controlled conditions as in the field (Table 2.7): Baccara and Capella were the most susceptible lines, whereas PI180693 and 552 were the most resistant ones. The lines displayed less RDI variability (from 2.56 to 3.63) than in growth chamber (2.75 to 4.15). Regarding the aerial index at both dates (AI1 and AI2), Baccara and Capella also appeared to be the most susceptible lines, and 552 the most resistant one. PI180693 and 902131 were more affected at the second date. MN313, intermediate at the first date, appeared to be much more affected at the second date.

DI in growth chamber and RDI in the field chamber were correlated (figure 1), although not significantly ($p=0.137$ and 0.06 in 1999 and 2000, respectively). Conversely, DI and aerial indices were strongly and significantly correlated, for AI1 ($p=0.028$ and 0.008 in 1999 and 2000, respectively) and AI2 ($p=0.02$ and 0.038 in 1999 and 2000, respectively).

DISCUSSION

To obtain the most relevant set of pea cultivars, our strategy was first to screen (in the test presented but also in preliminary field and chamber experiments) most of the resistant sources characterised elsewhere, with the first aim of retaining germplasm of good resistance level and of different genetic background (the respective genealogies of the lines, when known, were taken into account). The results showed that the available resistance sources, including the lines of the previous sets, displayed a incomplete level of resistance to the French *A.euteiches* isolates, but were more resistant than the European varieties.

The second point of our strategy was to investigate the presence of genotype x isolate interactions within a restricted group of cultivars and isolates, with the aim of including each of the interaction types observed (resistance patterns) in the final differential set. On this intermediary step, our work differentiates itself from the previous studies, where differential pea lines were only chosen according to their different resistance levels (Lockwood and Ballard, 1960; Beute and Lockwood, 1967; Duerst, 1996; Malvick and Percich, 1998a).

The resistance criterium was the second important thing to choose in the set up of the set, since this criterium has to traduce faithfully the host-pathogen interaction. Resistance of pea to *A.euteiches* was previously assessed by mortality occurrence : sum of dead plants from the fifth to the 16th day after inoculation (Beute and Lockwood, 1967), or number of dead plants 10 days after inoculation (Sundheim, 1972). But these criteria were shown to give contradictory information (Manning and Menzies, 1984), even when applied on the same set.

Percent of plant fresh weight has been also used as resistance criterium. Kraft *et al* (1994) considered resistant any line having a fresh biomass of at least 70% of its uninoculated control. However this criterium appeared poorly discriminant in our screening of pea germplasm. Moreover, this measure, expressing an overall response of the plant to the infection, may thus involve both resistance and tolerance components (*sensu* Rapilly (1991)), That is why, in the step relating to host-pathogen interactions, we chose to limit our resistance evaluation to disease index , a criterium directly linked to the pathogen effect.

In this study, the definition of resistance patterns and of virulence types was allowed by the fixation of a pathogenicity threshold at DI=1. This method was already used on this pathosystem to distinguish pathotypes referring to host preference (Holub *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998), and to distinguish groups among pea-infecting isolates (Malvick and Percich, 1998a; Malvick and Percich, 1998b), but using a threshold of 2.5 and even 3 (on a 0-5 disease scale). Our threshold, although low, was considered as the most biologically relevant one since up from this note, the fungus could be reisolated from the roots (i.e. was saprophytically active) and did form oospores in the roots (i.e. could fulfill its sexual reproduction). A similar methodology was used on the interaction *Brassica napus/Plasmodiophora brassicae* : the threshold 25, chosen on 0-100 scale, corresponds to

the formation of small galls on the lateral roots, that cannot lead to the formation of clubs on the taproot (Some *et al.*, 1996; Maria Manzanares-Dauleux, personal communication).

The set up process we used was similar to this followed by Ochoa *et al.* (1998) on the pathosystem quinoa (*Chenopodium quinoa* L.)/ downy mildew (*Peronospora farinosa* f.sp. *chenopodii*): after having characterised as susceptible or resistant the different disease reactions within a quinoa collection, with different fungal isolates, they postulated the presence of three resistance and four virulence factors, of unknown genetic determinism. The set we propose comprises six genotypes, representative of five "resistance patterns". Whether each of these patterns corresponds to a distinct resistance factor is not known; they could also be the result of one or several combinations of a few genes or QTLs, as recently demonstrated on the *B.napus/P.brassicae* pathosystem (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000). Evoking resistance and virulence factors requires to be sure that the susceptibility / resistance threshold corresponds to an incompatible reaction active at any inoculum pressure, or that it results in no subsequent symptom progression, as it was demonstrated in the pathosystem subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.)/ *Phytophthora clandestina* (Purwantara *et al.*, 1998).

In this study, the seedling reaction of the differential genotypes in controlled conditions was correlated with their behaviour in the field. The weak correlation of the disease index in growth chamber with the root disease index scored in the field could be related to the effect of other root pathogens, as *Fusarium solani*, *F. oxysporum* and *Phoma medicaginis* var. *pinodella*, or to the presence of different resistance factors that act after the seedling stage, in the course of time. However, the good correlation of the chamber results with the aerial symptoms in the field evokes a strong linkage between the seedling resistance expressed in the roots and the stunting and yellowing expressed at the adult stage. Whether this correlation is due to a delay in the infection of the resistant lines (which leads to think of pre-infection resistance components) or to a slowed disease progression, as Kraft tended to indicate in the case of PI180693 (Kraft and Boge, 1996), remains to be determined. So the specificity of the resistance of pea to *A.euteiches* requires to be better characterised, both at the seedling stage and in the field, regarding in one hand the expression of the host resistance and the pathogen virulence during the course of time, and on the other hand the different genes or QTLs involved in the resistance.

This set was set up after the confrontation of pea genotypes with a few isolates from France and other countries, whose behaviours were traduced in six virulence types. This set will permit to study the variability in virulence and aggressiveness of a much larger collection of *A. euteiches* isolates, to know whether other types exist throughout the world, and if French populations are characterised by specific virulence types.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the following researchers for having kindly provided isolates: Prof. Craig Grau (University of Wisconsin-Madison, WI, USA) for the isolates Ae172 and Ae173 ; Dr. Lars Persson (Nestlé R&D Bjuv, Sweden) for the isolate Ae147 (coded LP 83); Dr. Luc Couture (Agriculture and Agri-food Canada) for the isolate Ae163 and Ae164 (SRSF0671 and SRSF0672); Dr. Maureen Fletcher (Landcare Research New Zealand Ltd) for the isolate Ae139 (ICMP12294).

We are greatly indebted to Drs E.T. Gritton (University of Wisconsin-Madison), J.M. Kraft (USDA Prosser, WA), D.W. Davis (University of Minnesota-St Paul) and C. Simon (Plant Introduction Station of Pullman, WA) who kindly provided us genetic pea germplasm, and A. Baranger and G. Morin for having multiplied and provided to us seeds of all the resistant germplasm imported from the USA. We also thank D. Andrivon and A. Baranger for their critical comments on this manuscript.

REFERENCES

- Beute MK and Lockwood JL (1967) Pathogenic variability in *Aphanomyces euteiches*.
Phytopathology 57: 57-60
- Davis DW, Fritz VA, Pflieger FL, Percich JA and Malvick DK (1995) MN144, MN313, and MN314 : garden pea lines resistant to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* Drechs. Hort Sci 30: 639-640

-
- Davis DW, Shehata MA and Bissonnette HL (1976) Minnesota 108 pea breeding line. Hort Sci 11: 434
- Didelot D and Chaillet I (1995) Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In : AEP (ed) 2nd European Conference on Grain Legumes - Improving production and utilisation of grain legumes, Copenhagen- Denmark, July 9-13th: pp. 150.
- Duerst AE (1996) Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches* to pea and inheritance of resistance. University of Wisconsin- Madison, MS Thesis, Madison, Wisconsin, USA.
- Duparque M and Devaux-Boitel C (2001) Common root rot (*Aphanomyces euteiches*) reduces the yield of pea (*Pisum sativum*) by affecting the yield components, depending on the resistance level of the genotype. In : AEP (ed) 4th European Conference on Grain Legumes - Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products, Cracow- Poland, July 8-12th (accepted)
- Engqvist LG (1992) Studies on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas (*Pisum sativum*) in Sweden. Norw J Agric Sci 7: 111-118
- Gritton ET (1992) Registration of five pea root rot resistant germplasm lines of processing pea. Crop Sci 30: 1166-1167
- Gritton ET (1995) Offer of seed from the Earl Gritton pea Improvement program at Madison. Pis Genet 27: 29-30
- Hagedorn DJ (1984). Compendium of pea diseases. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA
- Holub EB, Grau CR and Parke JL (1991) Evaluation of the *forma specialis* concept in *Aphanomyces euteiches*. Mycol Res 95: 147-157
- Jones FR and Drechsler C (1925) Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*. J Agric Res 30: 293-325
- King TH, Davis DW, Shehata MA and Pflieger FL (1981) Minnesota 494-A11 pea germplasm. Hort Sci 16: 100
- Kraft JM (1981) Registration of 792022 and 792024 pea germplasm. Crop Sci 21: 352-353

-
- Kraft JM (1989) Registration of 86-638, 86-2197, 86-2231, and 86-2236 pea germplasms. Crop Sci 29: 494-495
- Kraft JM (1992) Registrations of 90-2079, 9062131 and 90-2322 pea germplasms. Crop Sci 32: 1076
- Kraft JM and Boge WL (1996) Identification of characteristics associated with resistance to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* in pea. Plant Dis 80: 1383-1386
- Kraft JM, Haware MP, Jiménez-Díaz RM, Bayaa B and Harrabi M (1994) Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. Euphytica 73: 27-39
- Lockwood JL (1960) Pea introductions with partial resistance to *Aphanomyces* root rot. Phytopathology 50: 621-624
- Lockwood JL and Ballard JC (1960) Evaluation of pea introductions for resistance to *Aphanomyces* and *Fusarium* root rots. MI Quarter Bulletin 42: 704-713
- Malvick DK, Grau CR and Percich JA (1998) Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity test and random amplified polymorphic DNA analyses. Mycol Res 102: 465-475
- Malvick DK and Percich JA (1996) Screening of pea plant introduction collection for resistance to *Aphanomyces* root rot. Biol Cult Tests 11: 112
- Malvick DK and Percich JA (1998a) Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from Central and Western United States. Phytopathology 88: 915-921
- Malvick DK and Percich JA (1998b) Variation in pathogenicity and genotype among single-zoospore strains of *Aphanomyces euteiches*. Phytopathology 88: 52-57
- Malvick DK and Percich JA (1999) Identification of *Pisum sativum* germplasm with resistance to root rot caused by multiple strains of *Aphanomyces euteiches*. Plant Dis 83: 51-54
- Manning MA and Menzies SA (1980) Root rot of peas in New Zealand caused by *Aphanomyces euteiches*. New Zealand J Agric Res 23: 263-265
- Manning MA and Menzies SA (1984) Pathogenic variability in isolates of *Aphanomyces euteiches* from New Zealand soils. New Zealand J Agric Res 27: 569-574

-
- Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R, Baron F and Thomas G (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. Theor Appl Genet 101: 885-891
- Ochoa J, Frinking HD and Jacobs T (1998) Postulation of virulence groups and resistance factors in the quinoa/downy mildew pathosystem using material from Ecuador. Plant Pathol 48: 425-430
- Papavizas GC and Ayers WA (1974) *Aphanomyces* species and their root diseases on pea and sugarbeet. U.S. Department of Agricultural Research Technical Bulletin 1485
- Persson L, Bodker L and Larsson-Wilkström M (1997) Prevalence and pathogenicity of foot and root rots of pea in Southern Scandinavia. Plant Dis 81: 171-174
- Purwantara A, Flett SP and Keane PJ (1998) Colonization of roots of subterranean clover cultivars by virulent and avirulent races of *Phytophthora clandestina*. Plant Pathol 47: 67-72
- Rapilly F (1991) L'épidémiologie en pathologie végétale. INRA editions, Paris.
- Scott WW (1961) A monograph of the genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, Blacksburg, Virginia.
- Some A, Manzanares M, Laurens F, Baron F, Thomas G and Rouxel F (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. Plant Pathol 45: 432-439
- Sundheim L (1972) Physiological specialization in *Aphanomyces euteiches*. Physiol Plant Pathol 2: 301-306
- Wicker E, Hullé M and Rouxel F (2001) Variability in pathogenicity on legume species of *Aphanomyces euteiches* Drechs. isolates recovered from pea (*Pisum sativum* L.) in France. Plant Pathol (submitted)
- Yokosawa R, Kuninaga S and Teranaka M (1974) [Note on pea root rot fungus, *Aphanomyces euteiches* Drechs. in Japan]. Ann Phytopath Soc Japan 40: 454-457 (in Japanese)

PARTIE II : Comportement spécifique des populations françaises d'*A.euteiches* en terme de virulence et agressivité sur pois

Cette partie a fait l'objet d'un article soumis le 21 Février 2001 à **European Journal of Plant Pathology** : "Specific behaviour of the French *Aphanomyces euteiches* populations for virulence and aggressiveness on pea", dont le texte intégral est présenté ci-après.

Démarche

Notre collection, composée de 95 isolats français d' *A.euteiches* et 22 isolats étrangers, dont certains de référence (Table 2.8), a été caractérisée sur la gamme différentielle à 6 génotypes préétablie (Figure 2.2), selon la méthodologie appliquée dans la partie I.

Tous ces isolats ont été préalablement caractérisés comme pathogènes sur pois, au vu d'études précédentes (Sundheim, 1972), ou lors de la caractérisation décrite dans le Chapitre 1.

Principaux résultats

- Comme lors de la mise au point de la gamme, l'analyse de variance montre une prépondérance des différences entre génotypes et entre isolats, alors que l'interaction isolat x génotype reste significative mais bien moindre (Table 2.10a).
- Parmi l'ensemble de la collection (Table 2.9), onze types de virulence (I à XI) ont été mis en évidence (Table 2.11). Parmi huit isolats non agressifs dans nos conditions de test figurent les isolats-référence de Sundheim (CBS155.73 et CBS156.73, censés représenter respectivement les races 3 et 4 (Sundheim, 1972)), ce qui rend malheureusement impossible toute comparaison de nos résultats avec ceux de cet auteur.
- Le type I, très majoritaire (82 isolats sur 109), rassemble les isolats les plus agressifs et virulents sur toute la gamme. Baccara est le génotype le plus sensible et PI1808693 le plus résistant. Une grande variabilité d'agressivité est observée à l'intérieur de ce groupe (Table 2.10b), et certains isolats moins agressifs ne classent pas les génotypes dans le même

ordre que la majorité du groupe (Figure 2.3), ce qui suggère l'existence d'effets différentiels se manifestant après pénétration du champignon dans la racine, au cours de la progression des symptômes.

- Les isolats français se distinguent des isolats étrangers à différents niveaux :
 - trois types de virulence (III, IV et V) ne sont représentés que par des isolats américains ou néo-zélandais. Le type III (avirulent sur MN313), est similaire au "groupe majeur" décrit aux USA par (Malvick & Percich, 1998) (Table 2.12).
 - les isolats français sont globalement plus agressifs que les isolats étrangers, américains en particulier (Table 2.13).

Specific behaviour of the French *Aphanomyces euteiches* Drechs. populations for virulence and aggressiveness on pea

E.WICKER^{1,2,a}, F.ROUXEL¹

¹ Unité Mixte de Recherche INRA-ENSAR 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes' - INRA –Centre de recherches de Rennes - Domaine de La Motte- BP 35327- 35653 LE RHEU Cédex-France

² Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes riches en Protéines (UNIP) – 12, Avenue Georges V – 75008 PARIS – France

^a Author for correspondance (Phone: (+33) 2 23 48 58 11; Fax:(+33) 2 23 48 51 80; E-mail: wicker@rennes.inra.fr)

Keywords : Oomycota, Leguminosae, pea common root rot, soilborne disease

ABSTRACT

The pathogenic variability of *Aphanomyces euteiches* on pea was investigated on a collection of 88 pea-infecting isolates from France and 21 isolates from Denmark, Sweden, Norway, USA, Canada and New-Zealand. Aggressiveness and virulence were assessed by scoring the root symptoms (disease index, or DI) caused by the pathogen on a differential set of six pea genotypes. Eleven virulence types were characterised. The virulence type I, previously described as virulent on the whole set, was greatly predominant, and rassembled the most aggressive isolates of all geographical origins. The other types were much less prevalent, rassembling one to five isolates. Three virulence types (III, IV, and V) contained no French isolate. The type III, avirulent on MN313, was composed of American isolates only, and resembled the "major group" recently described in the USA. A wide range of aggressiveness was found within the virulence type I, and the French isolates appeared globally more aggressive than the foreign isolates. These findings indicate that isolates from the virulenc type I should be used as references in breeding programs, and that PI180693 and 552 may be the most interesting resistance sources to date, despite their only partial resistance.

INTRODUCTION

Common root rot of pea, caused by *Aphanomyces euteiches* Drechs., has been one of the major yield-reducing factors for pea production, worldwide over the last eighty years (Papavizas and Ayers, 1974; Hagedorn, 1984; Persson *et al.*, 1997). Despite many attempts to control the disease, the only efficient measure to date is to avoid cultivation of pea in infested fields. Host resistance has been one of the most promising ways of reducing damage to the pea crops, but the development of an effective breeding strategy requires a good knowledge of the pathogenic variability of the fungus.

The first studies on the pathogenic variability of *A. euteiches* towards pea were conducted on a limited number of isolates from a single country. In the USA, Beute and Lockwood (1967) characterised two physiological races (races 1 and 2) among 15 American isolates according to the sum of mortalities they caused on a set of six pea genotypes. Sundheim (1972), using the same set but assessing resistance as number of dead plants 10 days after inoculation, established on 14 isolates from Norway that race 1 was also present in Norway, and described three new races (3, 4 and 5). However, Maanig and Menzies (1984) characterised 16 of 17 isolates from New Zealand tested as race 5 *sensu* Sundheim but also pointed out the ambiguous nature of the pathogenicity assessment, and the wide variation in pathogenicity within races defined by both Beute's and Sundheim's methods.

The most recent study was conducted on 114 isolates from Central and Western United States on a new differential set (Malvick and Percich, 1998) and assessed disease through root symptoms scores on a 0-5 scale. Four pathogenicity groups were found (Malvick and Percich, 1999). Two groups could be distinguished genotypically by RAPD markers and phenotypically by their behaviour on two differential genotypes, MN313 and MN314: the major group was avirulent, whereas the minor group was virulent. These groups were found to coexist within the same disease nursery.

In France, *Aphanomyces* root rot has recently developed, causing major damages on the pea crops (Didelot and Chaillet, 1995). Genetics appeared as one of the most promising control means, but the first field screening results, showing mixed behaviours of the resistant American lines, raised questions about the possible pathogenic variability existing within the

French pathogen populations, and between French and foreign (notably American) populations.

The objectives of the present study were thus to know whether the French *A. euteiches* populations displayed specific virulence/aggressiveness features, compared with some foreign isolates (including American ones), and whether virulence variability exists within the French populations. For that purpose, we assessed the pathogenic variability of a collection of representative French isolates, and of foreign isolates, including some reference strains. We based our study on a differential set of pea genotypes previously set up (Wicker *et al.*, 2001b), taking into account the different resistance sources available and the different isolate-genotype interaction types.

MATERIAL AND METHODS

Aphanomyces euteiches isolates

One hundred and nine isolates of *Aphanomyces euteiches*, all previously described as pathogenic on pea (Sundheim, 1972; Wicker *et al.*, 2001a), were tested: the 21 foreign isolates (Table 2.8), kindly provided by researchers, were all baited on pea except Ae173, baited on green bean. Nine were from Northern Europe (Sweden, Norway, Denmark), six from the USA, three from Canada, and three from New-Zealand. The 88 French isolates (Table 2.9) were isolated from soil by baiting with pea seedlings (*Pisum sativum* L., cv. Baccara) as described previously (Wicker *et al.*, 2001a), except Ae166, Ae167 and Ae169 which were baited on lentil (*Lens culinaris* L.) from a naturally diseased field, and Ae106 and Ae107 which were baited on alfalfa seedlings (*Medicago sativa* L.) in controlled conditions. Six main zones of origin were defined: 'Eastern Parisian Basin' (EPB, 49 isolates), 'Western Parisian Basin' (WPB, 16 isolates), 'Brittany' (10 isolates), 'North' (6 isolates), 'Centre' (4 isolates) and 'South-West' (3 isolates).

These isolates were characterised as *A. euteiches* according to the key of Scott (Scott, 1961), maintained on corn meal agar (CMA) (Difco, Detroit, MI) slants at 10°C, and transferred every six months to fresh CMA slants.

Differential set of pea genotypes

The virulence and aggressiveness of the *A. euteiches* isolates were assessed on a set of six pea genotypes: Baccara (Ets Desprez), Capella (Svalof Weibull AB), 902131, MN313, 552 and PI180693. The elaboration of this set and the characteristics of each genotype were previously described (Wicker *et al.*, 2001b).

Testing conditions

Zoospores of *A. euteiches* were produced as previously described (Wicker *et al.*, 2001a). Motile zoospores were counted with a Malassez haemocytometer, and their concentration adjusted to 200 zoospores/ml of suspension.

Each treatment consisted of a tray with five randomized plastic pots containing 250 ml of vermiculite (Vermex M, Bretagne Matériaux, 35570 L'Hermitage, France). These five pots were considered as replicates. Four seeds of pea were sown per pot, and the vermiculite was dampened with tap water. Plants were grown in a growth chamber with a 16 h light : 8 h dark regime, with a temperature regime of 25°C and 23°C respectively.

When seedlings were seven days old, 20 ml of a zoospore suspension were dispensed on the vermiculite over the entire area of the pot, for a total of 10^3 zoospores per plant. The same quantity of water was dispensed on the uninoculated control. Vermiculite was then saturated with water to optimise infestation, and was watered as required over the following days to keep the substrate moist.

The entire study comprised eight batches of 7 to 20 isolates; Ae5 was included as a reference isolate in each batch. As the Ae5 pathogenicity data did not differ significantly between dates (data not presented), the eight batches were considered as the same experiment.

Pathogenicity assessment

Seven days after inoculation, the plants were removed from vermiculite and the root symptoms were assessed visually on a 0-5 scale (Wicker *et al.*, 2001a) giving a disease index (DI).

A virulence threshold was established at DI=1: each genotype x isolate interaction resulting in a DI equal or superior to 1 was considered as compatible, whereas interactions giving a DI inferior to 1 were considered incompatible, since the fungus couldn't infect its host nor reproduce itself in the roots (Wicker *et al.*, 2001b). The response of the six differential genotypes according to this threshold allowed to characterise virulence types.

Data analysis

The genotype, isolate and genotype x isolate interaction effects on the DI were analysed for variance (ANOVA) using the software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

The frequency distributions of the virulence types within the different geographical origins (countries, and regions of France) were compared, using χ^2 test (Microsoft Excel 97).

RESULTS

At the inoculum level applied, eight of the 109 *A. euteiches* isolates tested (Table 2.9) caused no symptoms on all the set, including the susceptible control Baccara.

These non-aggressive isolates (NA) included the reference strains CBS155.73 (Ae134) and CBS156.73 (Ae135), previously named "race 3" and "race 4" respectively (Sundheim, 1972), as well as the isolates Ae25, Ae39, Ae45, Ae49, previously characterised as pea-vetch (PV) isolates, and Ae23 and Ae36 characterised as pea-vetch-alfalfa (PVA) isolates (Wicker *et al.*, 2001a).

Among the 101 infective isolates, including the isolates from lentil, alfalfa and green bean, a great variability in virulence and aggressiveness was observed.

Analysis of variance

The genotype, isolate and genotype-isolate interaction effects were highly significant (Table 2.10a). However, the contributions to the total variance of the genotype and isolate effects were much higher than the contribution of the interaction, indicating that the differences of resistance between pea genotypes, and of aggressiveness between isolates, were predominant over the differential effects.

Variability in virulence

Virulence types

On the basis of the threshold $DI=1$, eleven virulence types were established (Table 2.11), including six (I to VI) that were previously described (Wicker *et al.*, 2001b). The virulence type I, virulent on all the genotypes, rassembled most of the isolates (82). The virulence type II, avirulent on PI180693, rassembled five isolates. The virulence type VI, only virulent on BACCARA, grouped three isolates.

The other virulence types were minor groups : the types III (avirulent on MN313), VIII (avirulent on MN313, 552 and PI180693) and X (avirulent on 902131, 552, PI180693) grouped two isolates each. The types IV (avirulent on MN313 and 552), V (avirulent on

902131 and PI180693), VII (avirulent on 552 and PI180693), IX (VII with avirulence on Capella) and XI (avirulent on 902131 and 552) were represented by a single isolate.

Situation in France

Within the 82 French isolates, eight virulence types were found (Table 2.12). Type I was highly predominant, and found in all regions (Table 2.9). Type II grouped three isolates (all in EPB), and all the other virulence types (VI to XI) were minor. The isolates from lentil (Ae166, Ae167, Ae169) and from alfalfa (Ae106 and Ae107) were all in Type I.

The distributions of each virulence type (I to XI) within regions were not different from their expected values (χ^2 test, $p=0.16$ (type IX) to 0.99 (type I)) which meant that no geographical virulence specificity appeared among the French isolates, as far as sampling allowed us to investigate this regional variability.

Comparison between situations in France and in other countries

Four virulence types were present both in France and foreign countries (Table 2.12). The type I grouped isolates from France and from Northern Europe (Sweden and Denmark), USA and New-Zealand. The type II comprised French, Swedish and New Zealand isolates. VI and X grouped French and Canadian isolates.

Conversely, three virulence types were not found in France. The type III was only displayed by American isolates (Ae109, Ae173). The type IV was represented in New-Zealand only (Ae139) and the type V in Canada (Ae163).

Three virulence types were displayed by French isolates only : VII, VIII and XI.

Variability in aggressiveness

Aggressiveness levels in the French and foreign situations

The relative aggressiveness of the *A.euteiches* isolates was estimated by the mean disease index (DI) caused on the susceptible control Baccara. The French isolates caused a mean DI of 3.60 ± 0.79 on this genotype, and ranked the differential pea lines, in term of decreasing susceptibility, as : Baccara > Capella > MN313 > 902131 > 552 > PI180693 (Table 2.9).

The foreign isolates were globally less aggressive (DI on Baccara of 2.87 ± 0.69). Moreover, they ranked the differential pea lines in a different way: Baccara > Capella > 902131 > 552 > MN313 > PI180693.

The isolates were also classified in four aggressiveness subdivisions, corresponding to each interval of DI note from 1 to 5 ([1.0 - 2.0[, [2.0 - 3.0[, [3.0 - 4.0[and [4.0 - 5.0]). No foreign isolate was present in the interval [4.0 – 5.0], corresponding to the most aggressive isolates, whereas the French isolates were present in each of the four intervals (Table 2.13).

The frequency distributions of the foreign isolates within the aggressiveness intervals were significantly different from their expected distributions (χ^2 test, $P=0.01$), whereas the frequency of very aggressive isolates (interval [4.0-5.0]) is significantly different from the expected value (χ^2 test, $P<0.01$). So, the foreign isolates seem to be significantly less aggressive than the French isolates.

Within the French collection, the distributions of aggressiveness intervals within regions were not different from their expected values (χ^2 test, $P=0.07$ to 0.82), implying that no geographical aggressiveness specificity appeared among the French isolates. Very aggressive isolates were found within all regions (Table 2.9).

Aggressiveness levels and virulence types

When both French and foreign isolates were considered, the relative aggressiveness was highest for the isolates of the virulence type I (Table 2.13), since DI on Baccara ranged from 2.6 (interval [2.0-3.0]) to 5.0.

The isolates of the types II and III were found in the intervals [2.0 – 3.0[and [3.0 – 4.0[, whereas these of the other virulence types were in the two intervals of lesser aggressiveness.

Differential effects within the virulence type I

Analysis of variance showed highly significant genotype, isolate and interaction effects within the isolates of Type I (Table 2.10b), indicating that differential interactions, although not predominant, were also found within this type.

Most of the isolates ranked the genotypes, from susceptible to resistant, as : Baccara > Capella > MN313 > 902131 > 552 > PI180693 (Figure 1A). PI180693, the most resistant line, displayed a DI from 3.2 (Ae57, WPB) to 1.05 (Ae42, North) (Table 2.9).

However, nine isolates didn't rank the genotypes into the same way. Ae110 and Ae142 (from the USA, Figures 2.3B and 2.3C) were much less aggressive on MN313 (having a behaviour closer to the virulence type III). Ae106 (EPB, France) was least aggressive on MN313 and 902131 (Figure 2.3D). Ae75 (WPB, France) was least aggressive on 902131, whereas Ae42 (North, France) was least aggressive on 902131 and PI180693, displaying a behaviour close to the virulence type V (Figures 2.3J and 2.3G, respectively). Ae85 (EPB, France), Ae41 (WPB, France), Ae52 and Ae82 (both from Brittany, France), were least aggressive on 552 (Figures 2.3E, 2.3F, 2.3H and 2.3I respectively).

DISCUSSION

This study is the first tentative large-scale comparison of the diversity in virulence and aggressiveness on pea of *A. euteiches* isolates from Europe, America and New-Zealand.

Eleven virulence types were described, but one (Type I) largely predominated, constituted of the most aggressive isolates. The other types were much less prevalent, at least in France, and rassembled isolates that were also moderately to weakly aggressive on the susceptible control Baccara. The non-pathogenicity of the reference strains CBS155.73 and CBS156.73, representative respectively of the Sundheim's races 3 and 4 (Sundheim, 1972), made impossible a comparison between Sundheim's results and ours. The inconsistency of behaviour of these reference strains was already reported by Manning and Menzies (1984), and may be explained by the differences of methodologies (inoculum dose, incubation conditions), as well as by the age of the cultures.

The virulence type I was characterised by its ability to infect the whole set, which yet is composed of the most efficient resistance sources known, and was found within all the geographical origins (different countries and French regions). The reference strain from Kraft (Ae87=SP7) (Kraft *et al.*, 1994), as an example, was in this group. Moreover, the most aggressive isolates were from this type. Breeding programs for resistance to *A.euteiches*

should take into account this type of isolates, particularly in the greenhouse screening trials. Some breeders are now using a strain of this type (Ae5) as an aggressive and representative reference of the French *A.euteiches* populations (Moussart *et al.*, 2001). Furthermore, the most partially resistant line, PI180693, can be used as a control ; this line, as well as 552, seem to be the most interesting sources of resistance to date, despite their partial resistance. Their field behaviour have been considered as interesting : they both express the disease symptoms later than the other lines (M. Duparque, personal communication 2000). However PI180693 has a "wild-type" phenotype, which makes its use difficult in breeding programs ; 552 has the advantage of being partially resistant, and having also desirable agronomical traits.

Over than all, the aim of resistance breeding programs should be now to obtain germplasm of a much better resistance level, with desirable agronomical traits, but also screen new potential sources of more resistant germplasm.

Three virulence types were not found in France, nor in Europe : III (avirulent on MN313) which was similar to the "major group" described in the USA by Malvick and Percich (1998); IV (avirulent on MN313 and 552) and V (avirulent on 902131 and PI180693). The interesting point concerns the avirulence or low aggressiveness on MN313, which was only displayed by American isolates (Ae109 and Ae173 in Type III, Ae110 and Ae142 in Type I). These results suggest that the genotype MN313 carries a resistance factor which is highly efficient against a part of the US populations, but not against any of the French *A. euteiches* populations.

Conversely, the virulence types VII, VIII and IX and XI were only found in France. However, we lack *A. euteiches* samples from the different other countries to assert with certainty that these types are specific of the French populations.

This study showed also a wide range of aggressiveness within the dominant type, and underlined the higher aggressiveness of the French isolates compared to the foreign isolates. This point, which was also observed during American experiments (JM Kraft, personal communication, 1999), added to the absence of some virulence types, lead to the hypothesis that there is obviously a differentiation of the French populations for virulence and aggressiveness, towards in particular the American populations. The reasons of this particularity may be related to the differences in crop rotations between France and foreign countries, or to the history of pea cropping in the different countries. Additional data and experiments are required to go further in these speculations.

In this study, the virulence types were defined by the use of a criterium dealing with the early stages of the plant-pathogen interaction, when the pathogen tries to penetrate the root tissues, and to invade the whole root system: the reaction was considered incompatible if the fungus didn't succeed its infection. But the results also showed that some isolates of the virulence group I were less aggressive on MN313 or 552, whereas the majority of the isolates were least aggressive on PI180693. There may be other resistance factors, expressing after the successful penetration of the fungus, that were possibly not taken into account with this methodology. Kraft (1996) showed that resistance of pea to *A. euteiches* was expressing through different quantitative components, that were pre- and post infection events : a lower zoospore germination in the exsudates of the resistant line, as well as a slower progression of the symptoms in the roots, and a lower formation of oospores in root tissues. In the pathosystem subterranean clover/*Phytophthora clandestina*, evidence exists that race-specific resistance could express after the penetration of the fungus in the roots, by limiting the degree of root colonisation (Purwantara *et al.*, 1995; Purwantara *et al.*, 1998). Additional studies should be done to characterise the expression of resistance of pea to *A.euteiches* in the course of time, as well as the race-specificity or non-specificity of the components of this resistance.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are greatly indebted to the following researchers who kindly provided us isolates: Prof. Craig Grau (University of Wisconsin-Madison, WI, USA) and Dr J.M. Kraft for most of the American isolates; Dr. Lars Persson (Nestlé R&D Bjuv, Sweden) for the Swedish isolates; Prof. Søren Rosendahl (University of Copenhagen, Denmark) for the Danish isolates; Dr. Luc Couture (Agriculture and Agri-food Canada) for the Canadian isolates; Drs. Maureen Fletcher (Landcare Research New Zealand Ltd) and Allison Stewart (University of Canterbury) for the isolates from New-Zealand.

We thank D. Andrivon et B. Tivoli for their critical comments on the manuscript.

REFERENCES

- Beute MK and Lockwood JL (1967) Pathogenic variability in *Aphanomyces euteiches*. *Phytopath* 57: 57-60
- Didelot D and Chaillet I (1995) Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. In : AEP (ed) 2nd European Conference on Grain Legumes - Improving production and utilisation of grain legumes, Copenhagen- Denmark, July 9-13th: pp. 150.
- Hagedorn DJ (1984). Compendium of pea diseases. The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA
- Kraft JM and Boge WL (1996) Identification of characteristics associated with resistance to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* in pea. *Plant Dis* 80: 1383-1386
- Kraft JM, Haware MP, Jiménez-Díaz RM, Bayaa B and Harrabi M (1994) Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. *Euphytica* 73: 27-39
- Larsson M (1994) Pathogenicity, morphology and isozyme variability among isolates of *Aphanomyces* spp. from weeds and various crop plants. *Mycol Res* 98: 231-240
- Malvick DK, Grau CR and Percich JA (1998) Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity test and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycol Res* 102: 465-475
- Malvick DK and Percich JA (1998) Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from Central and Western United States. *Phytopath* 88: 915-921
- Malvick DK and Percich JA (1999) Identification of *Pisum sativum* germplasm with resistance to root rot caused by multiple strains of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Dis* 83: 51-54
- Manning MA and Menzies SA (1984) Pathogenic variability in isolates of *Aphanomyces euteiches* from New Zealand soils. *NZ J Agric Res* 27: 569-574
- Moussart A, Wicker E and Rouxel F (2001) Development of an efficient test in controlled conditions to screen for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. In : AEP (ed) 4th European Conference on Grain Legumes - Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products 4th European Conference on Grain Legumes, Cracow, Poland, July 8-12th.

-
- Papavizas GC and Ayers WA (1974) *Aphanomyces* species and their root diseases on pea and sugarbeet. U.S. Department of Agricultural Research Technical Bulletin 1485
- Persson L, Bodker L and Larsson-Wilkström M (1997) Prevalence and pathogenicity of foot and root rots of pea in Southern Scandinavia. *Plant Dis* 81: 171-174
- Pfender WF and Hagedorn DJ (1982) *Aphanomyces euteiches* f. sp. *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopath* 72: 306-310
- Purwantara A, Flett SP and Keane PJ (1995) Variation in pathogenicity and virulence of *Phytophthora clandestina* on four cultivars of subterranean clover. *Austral J Exper Agric* 35: 717-724
- Purwantara A, Flett SP and Keane PJ (1998) Colonization of roots of subterranean clover cultivars by virulent and avirulent races of *Phytophthora clandestina*. *Plant Pathol* 47: 67-72
- Scott WW (1961) A monograph of the genus *Aphanomyces*. Virginia Agricultural Experiment Station Technical Bulletin, Blacksburg, Virginia.
- Sundheim L (1972) Physiological specialization in *Aphanomyces euteiches*. *Physiol Plant Pathol* 2: 301-306
- Wicker E, Hullé M and Rouxel F (2001a) Pathogenic characteristics of isolates of *Aphanomyces euteiches* recovered from pea in France. *Plant Pathol* (accepted)
- Wicker E, Moussart A, Duparque M and Rouxel F (2001b) Setting up of a differential set of pea cultivars (*Pisum sativum* L.) to investigate the virulence of *Aphanomyces euteiches* Drechs. isolates. *Europ J Plant Pathol* (submitted)

DISCUSSION -CONCLUSION

Par cette étude, nous avons défini une gamme qui représente, au moins d'après les généalogies de lignées, différentes sources de résistance. Chaque génotype retenu correspond à un "type de résistance" particulier, évalué statistiquement selon un critère de résistance objectif, qui fait référence aux phénomènes de reconnaissance précédant juste l'infection et intervenant dans les premières phases de l'infection.

Cette démarche est relativement originale, comparée aux précédents travaux, qui proposaient des gammes à cinq ou six génotypes alors que deux types de résistance seulement étaient révélés (Malvick & Percich, 1998a).

Cependant, nos conditions expérimentales (notation sur jeunes plantes à une seule date) n'ont probablement pas permis de prendre en compte toutes les composantes de la résistance, notamment celles s'exprimant après la pénétration. Lors d'études annexes pour valider le seuil de virulence, nous avons pu mettre ainsi en évidence des différences de cinétique d'évolution des symptômes en fonction des isolats d'*A.euteiches* testés (données non présentées). Certaines des composantes de cette résistance pourraient être liées à des QTL différents, dont certains pourraient être spécifiques d'isolat, comme cela a été démontré dans la résistance quantitative de la tomate à *Ralstonia solanacearum* (anciennement *Pseudomonas solanacearum*) (Young, 1996). L'étude de l'expression de la résistance au cours du temps, et la mise en évidence de ses différentes composantes, constituent quelques-unes des perspectives prioritaires pour la poursuite de ce travail.

Cette étude a démontré par ailleurs que les populations françaises d' *A.euteiches* possèdent des caractéristiques spécifiques : les isolats français sont globalement plus agressifs que les isolats étrangers ; certains types de virulence identifiés à l'étranger n'ont pas été révélés en France. La variabilité mise en évidence par rapport au pois consiste surtout en des différences d'agressivité : le type de virulence I est grandement majoritaire, présent dans toutes les régions échantillonnées, avec une importante variabilité en agressivité.

Pour leurs programmes de sélection variétale, et plus particulièrement leurs criblages en conditions contrôlées, les sélectionneurs sont incités à choisir un isolat représentatif du type de virulence I (Moussart *et al.*, 2001). Par ailleurs, les lignées 552 et PI180693, bien que partiellement résistantes, apparaissent actuellement comme les meilleurs géniteurs de résistance disponibles.

Cette étude a mis également en évidence la différence notable de comportement des populations françaises par rapport à certains isolats américains, vis-a-vis de deux géotypes de pois :

Nous avons montré que la lignée MN313 est résistante à certains isolats américains, mais pas aux isolats français. La lignée 90-2079 présente quant à elle un bon niveau de résistance partielle contre des isolats américains en conditions semi-controlées et au champ (ML Pilet, C.Coyne, communication personnelle 2001), mais donne de moins bons résultats en France (M. Duparque, communication personnelle 2000). Or 90-2079 et MN313 ont un parent commun: 792022 (Synthèse bibliographique, p.19-20 et Figures S.8 et S.10).

Ces résultats ouvrent des perspectives sur la recherche du déterminisme génétique de la résistance. Il sera particulièrement intéressant de comparer la localisation des QTL de résistance chez ces trois lignées, ce qui permettrait de savoir si 792022 possède un facteur de résistance partielle efficace contre les populations américaines, mais pas contre les populations françaises.

Table 2.1 *Pisum sativum* accessions evaluated for resistance against *Aphanomyces euteiches*

Name/code	Status	7.1.1.1 Ori gin	7.1.1.2 Reference or collection
BACCARA	Spring dry pea variety	France	Ets DESPREZ
SOLARA	Spring dry pea variety	Netherlands	Ets CEBECO
MISTRAL	Winter dry pea variety	France	Ets SERASEM
CAPELLA	Spring dry pea variety	Sweden	Svalöf Weibull AB
AGAT	Pea line	Belarus	Vavilov Plant Introduction Station
EFFEKT	Pea line	Belarus	Vavilov Plant Introduction Station
WI8904	Canning pea breeding line	USA	E.T.GRITTON,1992
WI9416	Canning pea breeding line	USA	E.T.GRITTON ,1995
200	Canning pea breeding line	USA	RRRS cycle #8- E.T.GRITTON, 1995
552	Canning pea breeding line	USA	cycle #8 RRRS - resistant to powdery mildew- E.T.GRITTON,1995
560	Canning pea breeding line	USA	cycle #8 RRRS - resistant to powdery mildew - E.T.GRITTON,1995
90-2079	Canning pea breeding line	USA	J.M.KRAFT,1992
90-2131	Canning pea breeding line	USA	J.M.KRAFT,1992
90-2322	Canning pea breeding line	USA	J.M.KRAFT,1992
MN313	Canning pea breeding line	USA	D.W.DAVIS <i>et al</i> ,1995
MN314	Canning pea breeding line	USA	D.W.DAVIS <i>et al</i> ,1995
MELROSE	Pea line	USA	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI169600	Pea line	Turkey	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI180693	Pea line	Germany	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI210641	Pea line	USA	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI210642	Pea line	USA	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI244158	Pea line	Netherlands	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI244162	Pea line	Netherlands	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI257593	Pea line	Ethiopia	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI269802	Pea line	U.K.	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI272212	Pea line	Ethiopia	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI306592	Pea line	Hungary	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI343984	Pea line	Turkey	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI343986	Pea line	Turkey	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI393487	Pea line	Czech Republic	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI413686	Pea line	Hungary	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI413696	Pea line	Hungary	USDA Plant Introduction Station, Pullman
PI471166	Pea line	India	USDA Plant Introduction Station, Pullman

Table 2.2 *Aphanomyces euteiches* isolates inoculated on pea genotypes for the set up of a set of differential pea genotypes

Code	Name	Date of isolation	Geographical origin		Host specificity ^b	
			Country	Region ^a	V.P.	Pathotype
Ae5		1995	France	EPB	PVAF	B
Ae6		1995	France	EPB	PVA	B
Ae33		1996	France	WPB	PVA	B
Ae40		1996	France	South-West	PVAF	B
Ae44		1996	France	EPB	PVAF	B
Ae78		1996	France	EPB	PVAF	A
Ae83		1997	France	Brittany	PVA	B
Ae84		1997	France	South-West	PVAF	A
Ae169		1998	France	EPB	PVAFB	
Ae147	LP83	1994	Sweden		PVA	
Ae139	ICMP12294	1994	New-Zealand		PVAF	
Ae163	SRSF-0671	unknown	Canada		PVA	
Ae164	SRSF-0672	unknown	Canada			
Ae172	P54	unknown	USA		PVA	
Ae173	B16	unknown	USA		PVAF	

^a Regions of origin of the isolates comprise the following departments :

Eastern Parisian Basin (EPB): Seine-et-Marne, Aisne, Marne, Val de marne.

Western Parisian Basin (WPB): Eure, Eure-et-Loir, Loir-et-Cher, Seine-Maritime, Yvelines.

Brittany: Finistère and Morbihan.

South-West: Charente-Maritime and Pyrénées-Atlantiques.

^b The host specificity was described by "virulence phenotypes"(VP) groups and "pathotypes" (Wicker *et al*, 2001). (P, V, A, F, B = pathogenic on pea, vetch, alfalfa, broad bean, green bean respectively) – the pattern A was at least moderately aggressive on all five species; the pathotype B was aggressive on pea, mildly aggressive on vetch and alfalfa, poorly aggressive on broad bean.

Table 2.3 Mean disease indices on roots and epicotyl and percents of top fresh weight on 33 pea genotypes, 7 days after inoculation with two *A.euteiches* isolates

Disease index (DI) ^b					Percent of the top fresh weight (PFW) ^c			
Genotype	Origin ^a	Ae5 ^d	Ae44		Genotype	Origin	Ae5	Ae44
SOLARA	FR	4,53 <i>a</i>	3,55 <i>b</i>		PI272212	P	42,01 <i>a</i>	53,88 <i>ab</i>
BACCARA	FR	4,20 <i>b</i>	4,40 <i>a</i>		SOLARA	FR	43,96 <i>a</i>	62,03 <i>abc</i>
EFFEKT	B	4,00 <i>bc</i>	3,20 <i>bcd</i>		BACCARA	FR	50,52 <i>ab</i>	49,69 <i>a</i>
MISTRAL	FR	3,75 <i>cd</i>	3,00 <i>bcde</i>		EFFEKT	B	52,28 <i>abc</i>	81,86 <i>cdefg</i>
AGAT	B	3,70 <i>cde</i>	3,42 <i>bc</i>		PI343986	P	57,73 <i>abcd</i>	77,32 <i>cde</i>
PI244158	P	3,65 <i>cdef</i>	3,00 <i>bcde</i>		PI269802	P	58,11 <i>abcde</i>	72,94 <i>bcd</i>
PI257593	P	3,52 <i>defg</i>	2,80 <i>bcde</i>		560	ETG	58,48 <i>abcde</i>	90,14 <i>defg</i>
PI413696	P	3,50 <i>defgh</i>	2,75 <i>cde</i>		CAPELLA	Sva	60,44 <i>abcde</i>	73,19 <i>bcd</i>
CAPELLA	Sva	3,47 <i>defgh</i>	3,32 <i>bcd</i>		PI244158	P	60,97 <i>abcdef</i>	86,81 <i>defg</i>
90-2079	JMK	3,47 <i>defgh</i>	3,15 <i>bcd</i>		90-2079	JMK	62,51 <i>abcdefg</i>	72,10 <i>bcd</i>
PI272212	P	3,45 <i>defgh</i>	3,05 <i>bcde</i>		PI169600	P	67,14 <i>bcdefgh</i>	73,81 <i>bcde</i>
MN314	DWD	3,45 <i>defgh</i>	2,55 <i>def</i>		PI257593	P	67,68 <i>bcdefgh</i>	89,34 <i>defg</i>
PI269802	P	3,42 <i>defgh</i>	2,75 <i>cde</i>		PI413696	P	70,95 <i>bcdefghi</i>	80,81 <i>cdefg</i>
PI210641	P	3,40 <i>defgh</i>	3,20 <i>bcd</i>		PI393487	P	71,18 <i>bcdefghi</i>	103,08 <i>fg</i>
MN313	DWD	3,40 <i>defgh</i>	2,68 <i>cdef</i>		MN314	DWD	71,86 <i>bcdefghi</i>	74,48 <i>bcde</i>
PI169600	P	3,37 <i>defgh</i>	3,07 <i>bcde</i>		90-2131	JMK	72,01 <i>bcdefghi</i>	78,48 <i>cdef</i>
PI306592	P	3,35 <i>defgh</i>	3,00 <i>bcde</i>		AGAT	B	72,90 <i>bcdefghi</i>	72,70 <i>bcd</i>
WI9416	ETG	3,32 <i>defgh</i>	3,05 <i>bcde</i>		MISTRAL	FR	74,49 <i>cdefghi</i>	102,96 <i>fg</i>
WI8904	ETG	3,30 <i>defgh</i>	3,25 <i>bcd</i>		PI244162	P	74,69 <i>cdefghi</i>	89,26 <i>defg</i>
90-2322	JMK	3,30 <i>defgh</i>	2,85 <i>bcde</i>		PI413686	P	75,15 <i>cdefghi</i>	98,81 <i>efg</i>
PI393487	P	3,25 <i>efghi</i>	2,10 <i>fg</i>		200	ETG	75,76 <i>cdefghi</i>	72,66 <i>bcd</i>
PI210642	P	3,22 <i>fghi</i>	3,05 <i>bcde</i>		552	ETG	75,78 <i>cdefghi</i>	92,09 <i>defg</i>
PI413686	P	3,20 <i>ghi</i>	2,60 <i>def</i>		PI471166	P	76,83 <i>defghi</i>	92,48 <i>defg</i>
90-2131	JMK	3,15 <i>ghi</i>	3,00 <i>bcde</i>		PI343984	P	77,38 <i>defghi</i>	77,14 <i>cde</i>
200	ETG	3,10 <i>ghi</i>	3,05 <i>bcde</i>		PI306592	P	78,27 <i>defghi</i>	84,53 <i>cdefg</i>
PI471166	P	3,10 <i>ghi</i>	2,90 <i>bcde</i>		PI210642	P	80,00 <i>defghi</i>	90,02 <i>defg</i>
MELROSE	P	3,10 <i>ghi</i>	2,67 <i>cdef</i>		WI8904	ETG	80,40 <i>defghi</i>	79,57 <i>cdef</i>
560	ETG	3,05 <i>ghi</i>	3,05 <i>bcde</i>		PI210641	P	80,77 <i>efghi</i>	94,15 <i>defg</i>
PI343986	P	3,00 <i>ghi</i>	2,95 <i>bcde</i>		90-2322	JMK	82,24 <i>fghi</i>	78,85 <i>cdef</i>
552	ETG	2,95 <i>hi</i>	2,62 <i>cdef</i>		WI9416	ETG	84,99 <i>ghi</i>	83,64 <i>cdefg</i>
PI244162	P	2,95 <i>hi</i>	2,37 <i>efg</i>		MN313	DWD	85,26 <i>hi</i>	97,94 <i>efg</i>

PI343984	P	2,75	<i>i</i>	3,00	<i>bcde</i>	PI180693	P	88,31	<i>i</i>	105,07	<i>g</i>
PI180693	P	2,75	<i>i</i>	2,00	<i>g</i>	MELROSE	P	93,23	<i>i</i>	99,80	<i>efg</i>
Mean ^c		3,27	<i>a</i>	2,96	<i>b</i>	Mean ^c		71,6	<i>b</i>	82,78	<i>a</i>

^aCountry of origin, or germplasm collection

FR : Variety registered in France

B : lines from Belarus

Sva : variety from Svalöf Weibull

ETG : from E.T. Gritton

JMK : from J.M. Kraft

DWD : from D.W. Davis

P : Pullman germplasm bank

^b Disease index (DI) was assessed according to a 0-5 scale - See the text for details

^c Percent of top fresh weight (PFW) was calculated as the ratio:

(aerial fresh weight of the inoculated line/aerial fresh weight of the uninoculated control) x 100

^d Means followed by the same letter in a column are not significantly different (p=0.05) according to Newman-Keuls test

^eMeans followed by the same letter in a row are not significantly different (p=0.05) according to Newman-Keuls test.

Table 2.4 Analysis of variance for disease index data on 13 pea genotypes, 7 days after inoculation with *Aphanomyces euteiches* isolates from different geographical origins

Source of variation	Degrees of freedom	Mean square (MS)
Genotype	12	9.52**
Isolate	13	55.82**
isolate x genotype	156	0.80**
Error	788	0.08

Table 2.5 Mean disease indices (0-5 scale) provoked by different *A. euteiches* isolates from France and the World, on 13 pea genotypes

Genotypes	Isolates from France (n=8)	Genotypes	Isolates from the World (n=7)
	Mean disease index ^a		Mean disease index ^b
BACCARA	3.73 <i>a</i> ^c	BACCARA	2.71 <i>a</i>
CAPELLA	3.32 <i>b</i>	CAPELLA	2.29 <i>b</i>
PI210641	2.93 <i>c</i>	PI210641	2.11 <i>c</i>
PI210642	2.93 <i>c</i>	PI244162	2.07 <i>cd</i>
PI393487	2.82 <i>cd</i>	PI413696	2.03 <i>cd</i>
MN314	2.81 <i>cd</i>	PI393487	2.01 <i>cd</i>
PI244162	2.73 <i>de</i>	PI210642	1.95 <i>cd</i>
MN313	2.68 <i>de</i>	902131	1.89 <i>de</i>
MELROSE	2.66 <i>de</i>	552	1.74 <i>ef</i>
902131	2.64 <i>e</i>	MN313	1.65 <i>fg</i>
PI413696	2.61 <i>e</i>	PI180693	1.60 <i>g</i>
552	2.48 <i>f</i>	MN314	1.56 <i>g</i>
PI180693	1.94 <i>g</i>	MELROSE	1.52 <i>g</i>

^a This mean was calculated from the DI results of Ae5, Ae6, Ae33, Ae40, Ae78, Ae83, Ae84, Ae169.

^b This mean was calculated from the DI results of Ae5, Ae139 (N-Zealand), Ae147 (Sweden), Ae163 and Ae164 (Canada), Ae172 and Ae173 (USA).

^c The means followed by the same letter within columns are not significantly different (Newman-Keuls test, p=0.05)

Table 2.6 Resistance/ susceptibility patterns defined by the threshold DI=1 within the pre-range of pea genotypes, confronted with 14 *A.euteiches* isolates from France and abroad

Genotypes	<i>A.euteiches</i> isolates ^a													
	Ae5 (FRA) ^b	Ae169 (FRA)	Ae33 (FRA)	Ae84 (FRA)	Ae40 (FRA)	Ae83 (FRA)	Ae147 (SUE)	Ae172 (USA)	Ae6 (FRA)	Ae78 (FRA)	Ae173 (USA)	Ae139 (NZe)	Ae163 (CAN)	Ae164 (CAN)
BACCARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CAPELLA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PI 210641	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PI 210642	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PI 413696	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
90-2131	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PI 244162	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PI 393487	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MELROSE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MN 313	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
MN 314	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
552	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
PI 180693	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Virulence types	I							II		III	IV	V	VI	

^a The isolates are defined as pathogenic (+) or non-pathogenic (-), according to the threshold DI=1 - See the text for details.

^b Geographical origin of the isolates : FRA= France, SUE= Sweden, USA= United States, NZe= New-Zealand, CAN= Canada

Table 2.7 Comparison of the behaviour of the pea-set in growth chamber (inoculated with Ae5) and in field trial in 1999 and 2000

Genotypes	Growth chamber (Ae5)		Field results 1999 (Courtacon)			Field results 2000 (Courtacon)		
	DI ^a		RDI ^b	AI1 ^c	AI2 ^d	RDI	AI1	AI2
BACCARA	3.94	a	3.88 a	4.50 a	5.50 a	3.63 a	6.33 a	7.33 a
CAPELLA	3.17	b	4.08 a	3.50 ab	4.50 a	3.65 a	5.33 ab	6.00 a
MN313	3.16	b	3.46 ab	3.00 ab	4.00 a	3.14 ab	4.66 bc	6.67 a
902131	3.07	b	2.53 ab	2.00 bc	2.67 a	3.25 ab	4.00 c	4.67 b
PI180693	2.82	c	2.78 b	1.00 c	3.00 a	2.84 b	3.00 c	4.33 b
552	2.79	c	1.96 ab	2.50 bc	2.50 a	2.56 b	3.00 c	3.00 c

^a DI = Mean disease index, assessed according to a 0-5 scale- See the text for details

^b RDI = mean root disease index, assessed in the field at the 11th of May 2000 , according to a 0-5 scale – See the text for details

^c AI1 = Mean aerial index assessed on May 27th 1999 and June 6th 2000, according to a 1-9 scale.

^d AI2 = AI assessed on June 9th, 1999 and June 15th 2000, according to a 1-9 scale.

Table 2.8 Foreign *Aphanomyces euteiches* isolates studied with their code number, country of origin, source, original name and some characteristics previously described

Code	Country	Source ^a	Original name	Characteristics and reference
Ae134	Norway	CBS	CBS155.73	race 3 (Sundheim, 1972)
Ae135	Norway	CBS	CBS156.73	race 4 (Sundheim, 1972)
Ae122	Sweden	LG Engqvist	94OI96	
Ae145	Sweden	L. Persson	LP R	(Larsson, 1994)
Ae146	Sweden	L. Persson	LP U	(Larsson, 1994)
Ae147	Sweden	L. Persson	LP 83	
Ae148	Sweden	L. Persson	LP97040	
Ae149	Sweden	L. Persson	LP96024	
Ae181	Denmark	S. Rosendahl	S63	
Ae87	USA	JM Kraft	SP7	Idaho (Kraft <i>et al.</i> , 1994)
Ae109	USA	CR Grau	467	Wisconsin (Malvick and Percich, 1998, 1999)
Ae110	USA	CR Grau	IHP30	Wisconsin
Ae142	USA	ATCC	ATCC46691	<i>A. euteiches</i> f.sp. <i>pisi</i> S11 (Pfender and Hagedorn, 1982)
Ae172	USA	CR Grau	P54	Pea pathotype (Malvick <i>et al.</i> , 1998)
Ae173	USA	CR Grau	B16	
Ae163	Canada	L. Couture	SRSF-0671	
Ae164	Canada	L. Couture	SRSF-0672	
Ae165	Canada	L. Couture	SRSF-0673	
Ae121	New-Zealand	A. Stewart	NZ1143	
Ae138	New-Zealand	ICMP	ICMP12291	
Ae139	New-Zealand	ICMP	ICMP12294	

^a CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

ATCC = American Type Culture Collection, Manassas (VA), USA

ICMP = International Collection of Microorganisms from Plants – Landcare Research
Auckland, New-Zealand

Table 2.9 *Aphanomyces euteiches* isolates with code number, geographical origin, disease index of six pea genotypes, and virulence type

Part 1 : isolates from France

Code	Origin ^c	Disease index on the differential set of pea genotypes ^d						Virulence type ^e
		Baccara	Capella	MN313	90-2131	552	PI180693	
Ae21	EPB	4,70	4,30	3,45	3,10	2,95	2,83	I
Ae116	EPB	4,60	3,45	3,35	3,35	3,05	2,85	I
Ae126	EPB	4,42	3,55	3,40	3,23	3,10	2,58	I
Ae19	EPB	4,35	3,25	3,30	3,20	2,95	3,00	I
Ae169	EPB	4,33	4,88	3,40	3,50	3,15	3,00	I
Ae132	EPB	4,32	3,35	3,30	3,33	2,88	2,95	I
Ae18	EPB	4,20	3,05	3,10	2,90	2,60	1,80	I
Ae125	EPB	4,05	3,15	3,23	3,40	2,90	2,88	I
Ae167	EPB	4,05	3,45	3,15	3,22	2,65	2,90	I
Ae28	EPB	4,00	3,60	3,55	3,20	3,05	2,40	I
Ae48	EPB	4,00	3,10	3,07	3,38	2,95	2,75	I
Ae63	EPB	4,00	3,35	3,00	3,02	2,70	2,75	I
Ae81	EPB	3,95	3,40	3,19	3,00	2,88	2,32	I
Ae5 ^a	EPB	3,91	3,14	3,14	3,06	2,77	2,84	I
Ae123	EPB	3,90	3,05	3,05	3,18	2,40	2,65	I
Ae43	EPB	3,85	2,55	3,00	1,93	2,10	1,30	I
Ae103	EPB	3,85	3,10	3,07	3,00	2,83	2,75	I
Ae24	EPB	3,78	3,75	3,55	3,30	3,05	2,60	I
Ae107	EPB	3,75	3,00	3,05	3,00	2,85	2,45	I
Ae115	EPB	3,75	2,90	3,15	3,00	2,80	2,10	I
Ae65	EPB	3,70	3,00	3,00	2,75	2,85	2,40	I
Ae117	EPB	3,60	3,20	3,10	2,58	2,90	2,58	I
Ae166	EPB	3,55	3,00	2,65	2,60	2,40	2,33	I
Ae12	EPB	3,50	2,75	2,80	2,85	2,25	1,75	I
Ae124	EPB	3,50	2,70	2,25	3,07	1,70	0,90	II
Ae127	EPB	3,50	3,37	3,25	3,30	3,00	2,93	I
Ae44	EPB	3,45	2,65	2,70	2,77	2,05	2,05	I
Ae46	EPB	3,45	2,95	3,00	2,98	2,45	2,05	I
Ae118	EPB	3,43	3,00	3,00	2,95	2,35	1,90	I
Ae128	EPB	3,40	3,20	3,10	3,30	2,95	2,95	I
Ae168	EPB	3,35	2,40	2,80	3,15	2,05	1,40	I
Ae1	EPB	3,28	3,10	3,00	2,95	2,90	2,45	I
Ae85	EPB	3,27	2,85	2,80	2,73	1,90	2,50	I
Ae55	EPB	3,20	3,00	3,00	3,00	2,55	2,45	I
Ae78	EPB	3,20	2,55	1,90	1,55	1,45	0,60	II
Ae130	EPB	3,05	2,65	2,95	2,63	1,70	1,90	I
Ae170	EPB	3,05	2,50	2,45	2,00	1,80	1,40	I
SOL49	EPB	3,05	3,05	3,05	3,05	2,45	2,25	I
Ae131	EPB	3,00	2,25	2,15	1,85	1,75	1,70	I
Ae6	EPB	2,65	1,93	1,05	1,20	1,10	0,73	II

Ae106	EPB	2,60	1,75	1,00	1,20	2,10	1,60	I
Ae16	EPB	2,25	1,75	1,45	1,65	0,65	0,57	VII
Ae37	EPB	2,15	1,35	0,85	1,10	0,75	0,35	VIII

Table 2.9

(continued)

		Disease index on the differential set of pea genotypes^d						Virulence
Code	Origin ^c	Baccara	Capella	MN313	90-		PI180693	type ^e
					2131	552		
Ae2	EPB	1,90	1,45	1,30	0,85	0,78	1,02	XI
Ae66	EPB	1,80	0,65	0,30	0,10	0,10	0,00	VI
Ae36	EPB	0,75	0,15	0,35	0,35	0,45	0,00	NA
Ae25	EPB	0,15	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
Ae23	EPB	0,00	0,05	0,10	0,00	0,15	0,05	NA
Ae45	EPB	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
Ae70	WPB	4,78	3,60	3,60	3,40	3,15	1,75	I
Ae33	WPB	4,68	3,78	3,05	3,00	3,05	2,30	I
Ae57	WPB	4,50	3,85	3,25	3,48	3,05	3,20	I
Ae76	WPB	4,50	3,20	3,30	3,30	3,05	2,75	I
Ae31	WPB	4,48	3,28	3,20	3,27	2,75	2,90	I
Ae59	WPB	4,25	3,30	3,44	3,13	3,32	2,55	I
Ae41	WPB	4,23	2,90	3,20	2,85	1,57	1,95	I
Ae34	WPB	4,05	3,30	3,42	3,25	2,90	3,00	I
Ae30	WPB	3,95	3,35	3,20	2,95	3,00	3,00	I
Ae144	WPB	3,95	3,10	3,00	3,00	2,90	2,85	I
Ae120	WPB	3,90	3,15	3,05	2,77	2,85	2,75	I
Ae75	WPB	3,60	2,55	2,63	1,97	2,25	2,25	I
Ae60	WPB	3,45	2,90	3,15	2,73	2,75	2,72	I
Ae22	WPB	2,00	1,30	1,22	0,45	0,43	0,15	X
Ae10	WPB	1,93	1,75	0,88	1,13	0,48	0,65	VIII
Ae32	WPB	1,10	0,40	0,10	0,10	0,10	0,00	VI
Ae53	Brittany	4,67	3,30	3,50	3,15	3,20	3,05	I
Ae29	Brittany	4,22	3,00	3,07	3,10	2,53	2,35	I
Ae52	Brittany	4,10	3,05	3,25	2,73	1,87	2,83	I
Ae82	Brittany	3,40	2,95	2,68	2,45	1,57	2,22	I
Ae171	Brittany	3,35	3,05	3,10	2,95	2,80	2,85	I
Ae83	Brittany	3,25	3,20	3,32	2,85	2,55	2,30	I
Ae7	Brittany	3,10	3,27	3,15	3,05	2,80	2,85	I
Ae54	Brittany	3,05	2,95	2,83	2,00	2,05	2,10	I
Ae92	Brittany	2,70	2,30	1,65	1,43	1,65	1,50	I
Ae51	Brittany	2,00	0,88	1,40	1,40	0,20	0,67	IX
Ae119	Centre	5,00	3,70	3,75	3,33	3,15	2,98	I
Ae71	Centre	4,15	3,40	3,50	3,40	3,10	2,50	I
Ae50	Centre	3,20	2,90	2,95	2,45	2,45	1,60	I
Ae72	Centre	3,20	3,25	3,05	2,50	2,90	2,00	I
Ae47	North	4,85	3,60	3,25	3,33	3,10	3,00	I
Ae27	North	4,70	3,20	3,30	3,17	2,65	2,40	I
Ae11	North	4,30	3,45	3,00	2,97	2,85	2,67	I
Ae26	North	4,15	3,10	3,00	2,47	2,95	1,65	I
Ae42	North	2,92	2,40	2,65	1,15	2,07	1,05	I
Ae49	North	0,05	0,00	0,00	0,00	0,40	0,05	NA
Ae84	South-	3,55	3,73	2,80	3,00	2,80	1,92	I

Ae40	West South- West	3,40	3,27	2,72	2,75	2,70	1,61	I
Ae39	South- West	0,00	0,00	0,00	0,05	0,10	0,00	NA
	Mean (std) ^f	3.60 (0.79)	2.93 (0.75)	2.79 (0.78)	2.65 (0.81)	2.38 (0.81)	2.14 (0.81)	

Part 2 : Isolates from other countries

Tableau 2.9 (continued)

Disease index on the differential set of pea genotypes^d								Virulence
Code	Country	Baccara	Capella	MN313	90- 2131	552	PI180693	type ^e
Ae122	Sweden	3,40	3,20	3,15	3,17	2,93	2,75	I
Ae147	Sweden	3,38	3,05	3,00	3,05	3,00	2,95	I
Ae148	Sweden	3,25	3,30	3,20	2,97	2,68	1,85	I
Ae149	Sweden	3,23	2,95	2,70	2,97	2,95	2,80	I
Ae146	Sweden	2,95	3,00	2,85	2,93	2,50	2,45	I
Ae145	Sweden	2,90	2,05	2,37	2,05	1,57	0,80	II
Ae181	Denmark	3,70	3,15	3,25	3,00	3,05	2,25	I
Ae134	Norway	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
Ae135	Norway	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
Ae142	USA	3,65	3,15	1,20	3,32	3,20	2,58	I
Ae87	USA	3,45	3,35	2,73	2,02	1,88	1,45	I
Ae109	USA	3,37	3,15	0,95	3,00	2,75	2,85	III
Ae110	USA	3,00	2,95	1,90	3,15	2,65	2,80	I
Ae172	USA	3,00	2,25	2,05	1,80	1,60	1,25	I
Ae173 ^b	USA	2,62	2,23	0,20	2,12	1,43	1,55	III
Ae163	Canada	1,95	1,42	1,78	0,95	1,65	0,35	V
Ae165	Canada	1,70	1,65	1,20	0,15	0,00	0,00	X
Ae164	Canada	1,30	0,93	0,50	0,35	0,80	0,15	VI
Ae138	New- Zealand	3,28	2,90	2,80	2,78	2,85	2,65	I
Ae139	New- Zealand	2,30	2,45	0,95	2,10	0,81	1,60	IV
Ae121	New- Zealand	2,15	1,85	1,65	1,85	1,15	0,40	II
	Mean (std) ^f	2.87 (0.69)	2.58 (0.72)	2.02 (0.97)	2.30 (0.96)	2.08 (0.94)	1.76 (1.02)	

^a The reference-isolate Ae5 was tested at each experiment (eight times).

The result is the mean of the eight experiments.

^b isolates tested twice. The result is the mean of two experiments

^c Country or region of origin of the isolate.

Eastern Parisian Basin (EPB) comprises Seine-et-Marne, Aisne, Marne, Val de Marne.

Western Parisian Basin (WPB) comprises Eure, Eure-et-Loir, Loir-et-Cher, Seine-Maritime, Yvelines.

Brittany comprises the departments Finistère and Morbihan.

North comprises Somme and Oise.

Centre comprises Indre, Cher, Creuse, Côte d'Or.

South-West comprises Charente-Maritime and Pyrénées-Atlantiques.

^d The disease index is assessed according to a scale from 0 to 5

^e The virulence types were determined according to a pathogenicity threshold of $DI=1$

NA= non-aggressive isolates in the test conditions.

^f The mean and standard deviation were calculated on the DI values of the infective isolates (82 from France and 19 from other countries)

Table 2.10a Analysis of variance for disease index assessed on 6 pea genotypes, after inoculation with 101 aggressive *Aphanomyces euteiches* isolates

Source	Degree of freedom	Mean Square
GENOTYPE	5	121.68**
ISOLAT	100	20.73**
ISOLAT*GENOTYPE	500	0.61**
Error	2735	0.09

** significant at $P < 0.01$

Table 2.10b Analysis of variance for disease index assessed on 6 pea genotypes, after inoculation with the 82 *A. euteiches* isolates of the virulence type I

Source	Degree of freedom	Mean Square
GENOTYPE	5	89.49**
ISOLAT	81	4.93**
ISOLAT*GENOTYPE	405	0.49**
Error	2143	0.08

** significant at $p < 0.01$

Table 2.11 Virulence types defined within the *A.euteiches* collection (101 infective isolates)

Virulence types	Disease response on the pea genotypes ^a						Number of isolates
	Baccara	Capella	MN313	902131	552	PI180693	
I	+	+	+	+	+	+	82
II	+	+	+	+	+	-	5
III	+	+	-	+	+	+	2
IV	+	+	-	+	-	+	1
V	+	+	+	-	+	-	1
VI	+	-	-	-	-	-	3
VII	+	+	+	+	-	-	1
VIII	+	+	-	+	-	-	2
IX	+	-	+	+	-	-	1
X	+	+	+	-	-	-	2
XI	+	+	+	-	-	+	1

^a The isolates causing a $DI < 1$ are considered non-pathogenic, and noted -. Those causing a $DI \geq 1$ are considered pathogenic and noted +.

Table 2.12 Distribution of the *A.euteiches* isolates from France and from other countries within the different virulence types

Virulence types ^a	Country of origin						Total isolates /virulence type
	FRANCE	Sweden	Denmark	USA	Canada	New-Zealand	
I	71	5	1	4	-	1	82
II	3	1	-	-	-	1	5
III	-	-	-	2	-	-	2
IV	-	-	-	-	-	1	1
V	-	-	-	-	1	-	1
VI	2	-	-	-	1	-	3
VII	1	-	-	-	-	-	1
VIII	2	-	-	-	-	-	2
IX	1	-	-	-	-	-	1
X	1	-	-	-	1	-	2
XI	1	-	-	-	-	-	1
Total isolates /country	82	6	1	6	3	3	101

^a The virulence types were determined according to the pathogenicity threshold DI=1

Table 2.13 Distribution of the 101 infective *A.euteiches* isolates within four levels of aggressiveness on BACCARA, as related to their geographical origin and virulence type

Origin	Aggressiveness classes ^a				Total
	[1.0-2.0[(n=7)	[2.0-3.0[(n=13)	[3.0-4.0[(n=52)	[4.0-5.0] (n=29)	
France					
Total	4	8	41	29	82
Virulence types					
I	-	3	39	29	71
II	-	1	2	-	3
VI	2	-	-	-	2
VII	-	1	-	-	1
VIII	1	1	-	-	2
IX	-	1	-	-	1
X	-	1	-	-	1
XI	1	-	-	-	1
Foreign countries					
Total	3	5	11	-	19
Virulence types					
I	-	1	10	-	11
II	-	2	-	-	2
III	-	1	1	-	2
IV	-	1	-	-	1
V	1	-	-	-	1
VI	1	-	-	-	1
X	1	-	-	-	1

^a The 101 isolates were dispatched into four classes according to their aggressiveness, assessed by DI on the cv. Baccara : [1.1-2.0[, [2.0-3.0[, [3.0-4.0[, [4.0-5.0]
The total number of isolates per interval are given within brackets.

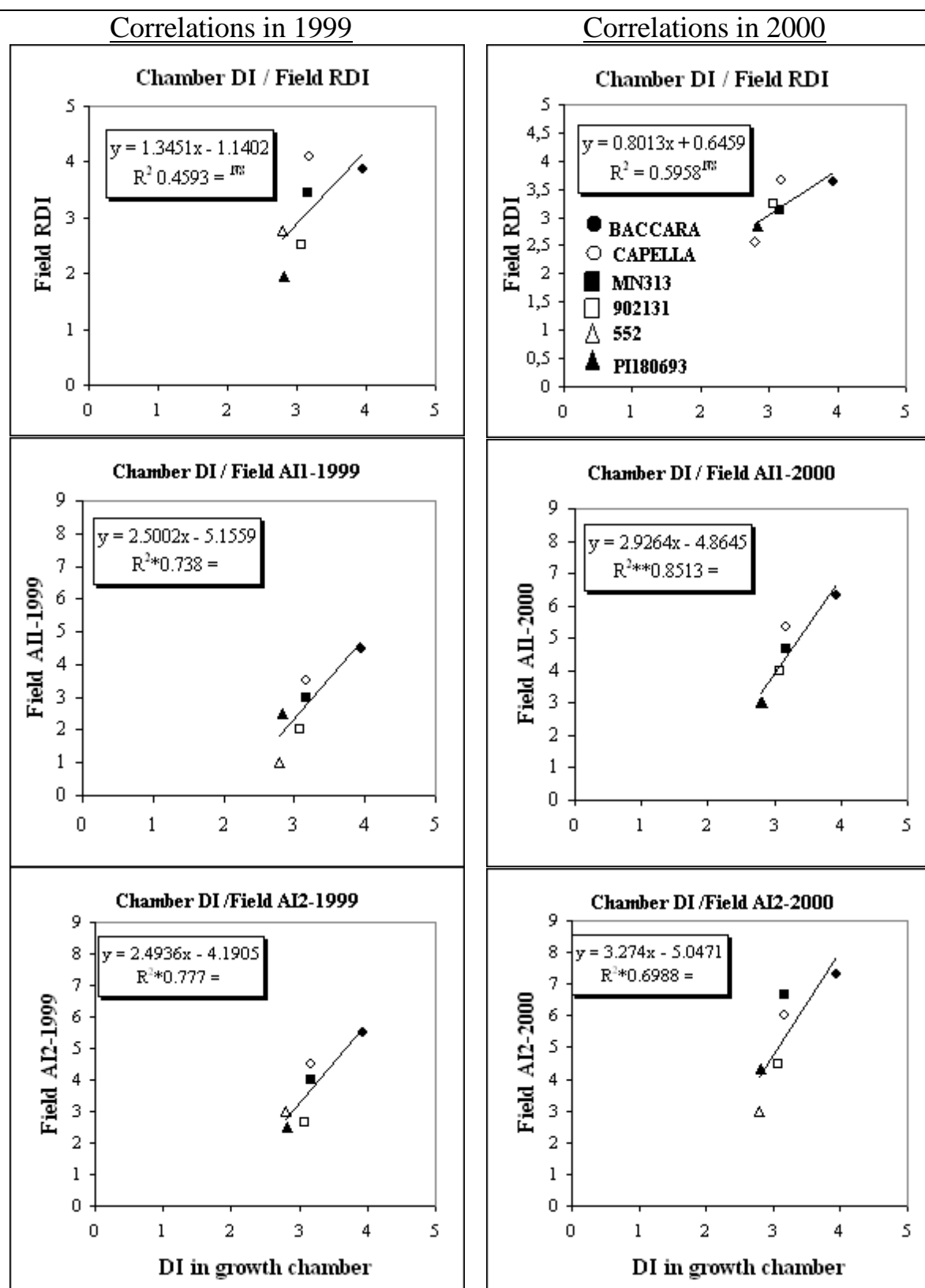


Figure 2.1 Correlations between the results of the set of pea genotypes in controlled conditions (disease index (DI) caused by Ae5) and in field trials (Courtacon) in 1999 and 2000, in term of root disease index (RDI) and aerial indices noted at two dates (AI1, AI2)

Legend

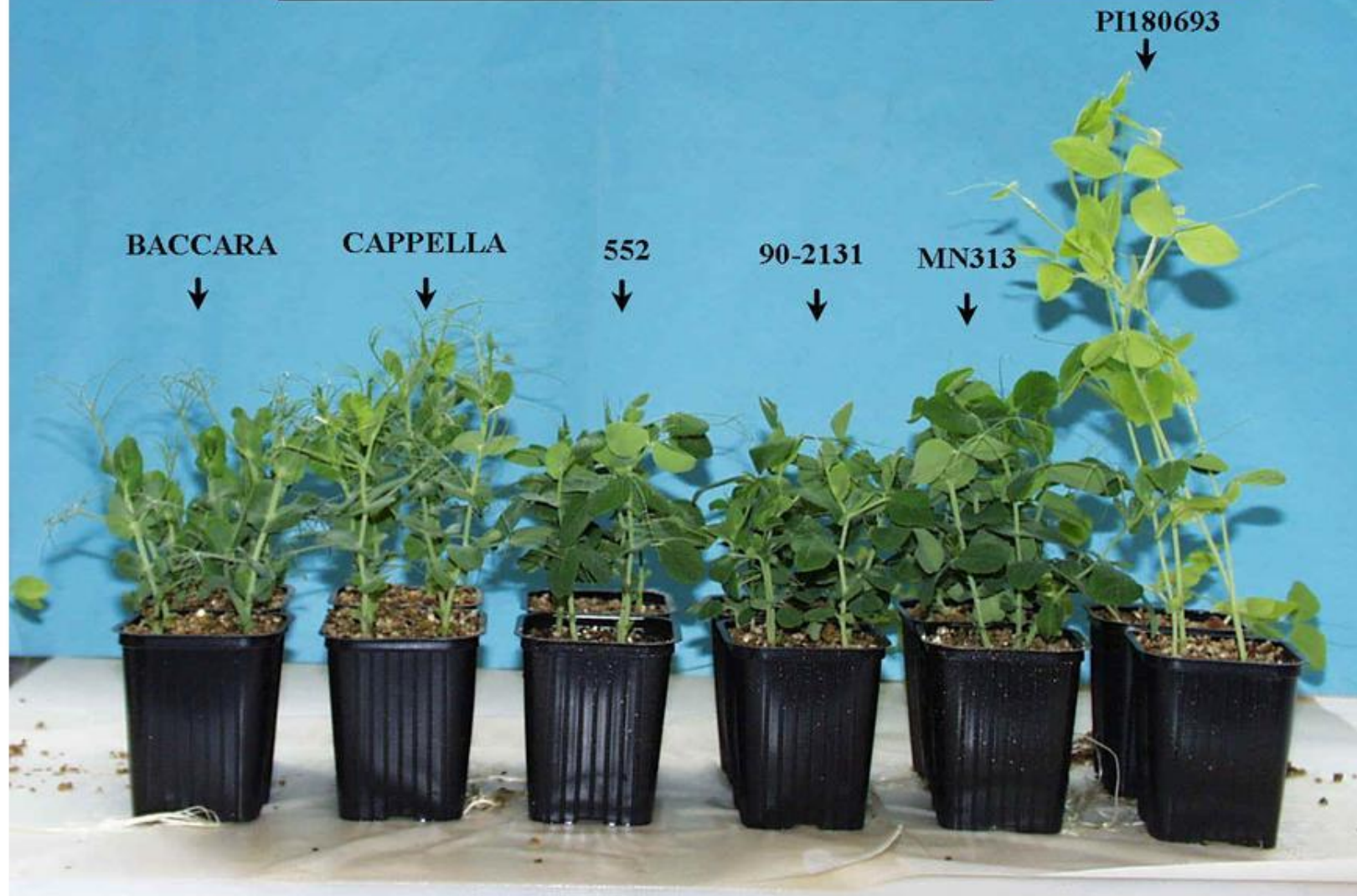
DI : Mean Disease index evaluated in growth chamber, 7 days after inoculation with Ae5, according to a 0-5 scale.

RDI : Root disease index assessed in the field, according to a 0-5 scale

AI1 : Aerial index assessed in the field, at the 27th of May 1999 and the 6th of June 2000, according to a 0-9 scale.

AI2 : Aerial index assessed in the field, at the 9th of June 1999 and the 15th of June 2000, according to a 0-9 scale.

Figure 2.2 Gamme différentielle de pois pour étudier l'interaction *A.euteiches* / pois



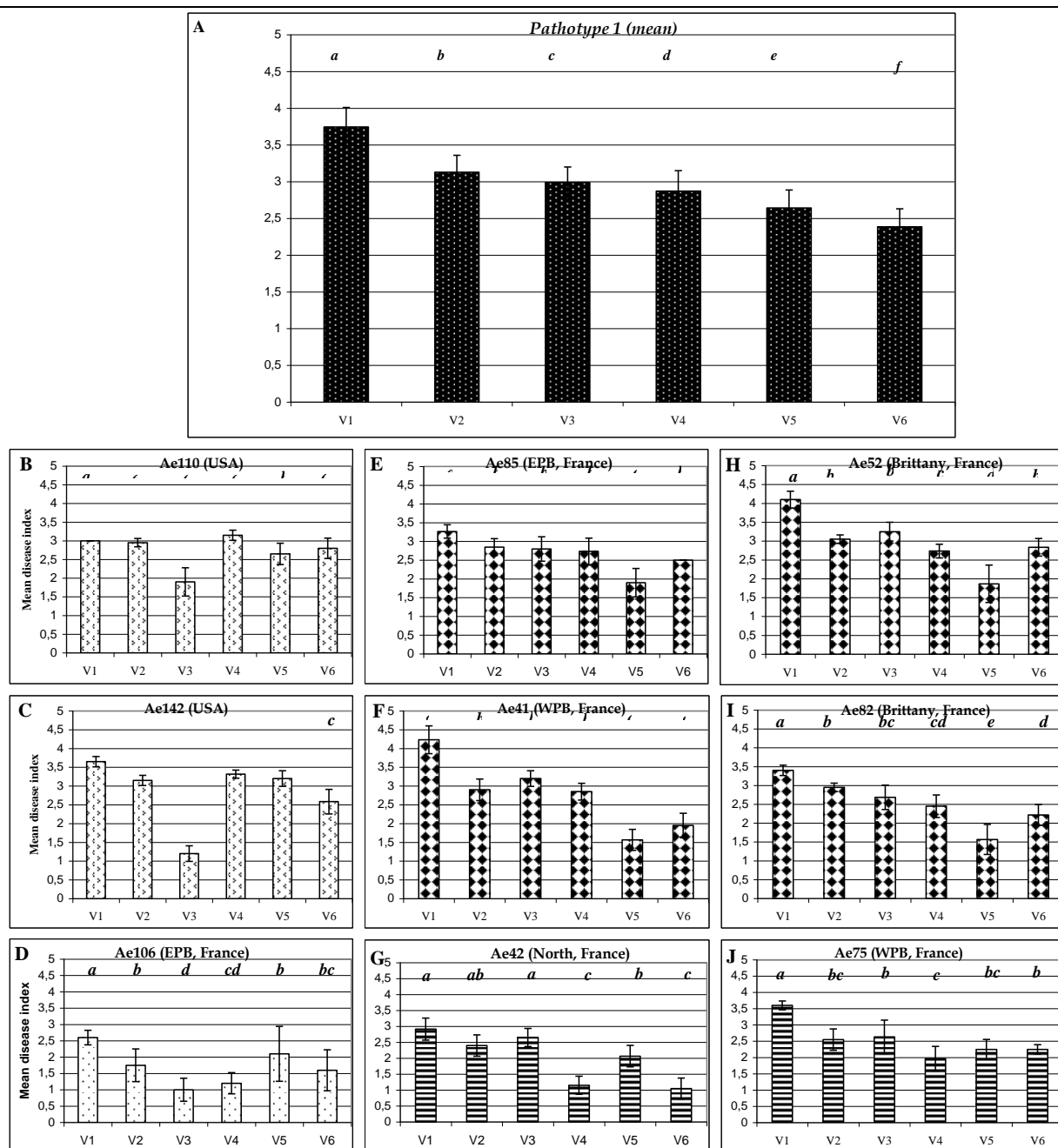


Figure 2.3 Aggressiveness patterns of *A. euteiches* isolates within the virulence type I obtained on the differential set (V1=Baccara, V2=Capella, V3=MN313, V4=902131, V5=552, V6=PI180693)

A : Mean pattern of 82 isolates from France and foreign countries

B-J : Patterns corresponding to particular isolates The bars marked by the same letter within the same graph are not significantly different (Newman-Keuls test, $P=0.05$)

Chapitre 3 : Analyse de la diversité génétique et structuration des populations d'*A.euteiches*

Erreur ! Liaison incorrecte.

Tableau 3.1: Isolats d' *Aphanomyces euteiches* utilisés dans la caractérisation AFLP

Partie 1: France

Code	Origine		Spécificité d'hote		Virulence/pois (VType)	Caractérisation AFLP	
	Plante hôte	Département	Phénotype de virulence	Pathotype		E+AAT /M+CTG	E+ACC /M+CGT
1. Est du Bassin Parisien							
Ae12 ^a	pois prot.	2	PVAF	B	I	x	x
Ae131	pois prot.	2	PVAF	B	I	x	x
Ae2	pois prot.	2	PVA	C	XI	x	
Ae63	pois prot.	2	PVA	B	I	x	
Ae65	pois prot.	2	PVAFB	A	I	x	
Ae78	pois prot.	2	PVAF	A	II	x	x
Ae8	pois prot.	2	PV	C	NT ^b	x	
Ae43	pois prot.	51	PVAF	B	I	x	x
Ae45	pois prot.	51	PV	C	NA ^c	x	
Ae125	pois	77	PVAF	B	I	x	x
Ae15	pois prot.	77	PVA	C	NT	x	x
Ae16	pois prot.	77	PVA	C	VII	x	x
Ae20	pois prot.	77	PVA	B	NT	x	
Ae5	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	x
Ae6	pois prot.	77	PVA	B	II	x	
Ae85	pois prot.	77	PVA	B	I	x	x

Ae44	pois prot.	91	PVAF	B	I	x	x
Ae36	pois prot.	95	PVA	C	NA	x	x
<i>Parcelle du Fretoy</i>							
SOL11	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL13	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL24	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL36	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL39	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL41	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL42	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL49	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL58	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL60	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL62	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL65	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL72	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL75	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL78	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	
SOL79	pois prot.	77	PVAF	B	I	x	

2. Région Bretagne

Ae29	pois prot.	56	PVAF	B	I	x	x
Ae52	pois potag.	29	PVA	B	I	x	x
Ae53	pois potag.	29	PVAF	B	I	x	x
Ae54	pois potag.	29	PV	C	I	x	x
Ae 83	pois prot.	29	PVA	B	I	x	x

Parcelle de Cléguerec

BRE89	féverole	56	PVAF	B	NT	x	
BRE90	féverole	56	PVAF	B	NT	x	
BRE91	pois	56	PVAF	B	NT	x	
BRE93	pois	56	PVAF	B	NT	x	
BRE94	pois	56	PVAF	B	NT	x	
BRE95	haricot	56	PVAF	B	NT	x	
BRE96	haricot	56	PVAF	B	NT	x	
BRE97	luzerne	56	PVAF	B	NT	x	
BRE98	luzerne	56	PVAF	B	NT	x	
BRE99	luzerne	56	PVAF	B	NT	x	
BRE101	luzerne	56	PVAF	B	NT	x	
BRE102	luzerne	56	PVAF	B	NT	x	

3. Région Centre

Ae71	pois prot.	21	PVAFB	A	I	x	x
Ae72	pois prot.	21	PVAFB	A	I	x	x
Ae80	pois prot.	36			NA	x	x
Ae119	pois	23	PVAF	B	I	x	
Ae129	pois	3			NT	x	

4. Autres régions

Ouest Bassin Parisien

Ae32	pois prot.	27			VI	x	
Ae34	pois prot.	27	PVAF	B	I	x	
Ae22	pois prot.	28	PVA	C	X	x	x
Ae59	pois prot.	41	PVAFB	A	I	x	

Nord

Ae11	pois prot.	80	PVAF	B	I	x	
Ae49	pois prot.	80	PV	D	NA	x	x
<i>Sud-Est</i>							
Ae192	pois prot.	69				x	
Ae198	pois prot.	38				x	x
<i>Sud-Ouest</i>							
Ae35	haricot	40				x	x
Ae 84	pois prot.	65	PVAF	A	I	x	x

Partie 2: Pays étrangers

Code	Origine		Spécificité d'hote		Virulence/pois (VType)	Caractérisation AFLP	
	Plante hôte	Pays	Phénotype de virulence	Pathotype		E+AAT /M+CTG	E+ACC /M+CGT
<u>Europe</u>							
Ae147	pois	Suède	PVA	nc^d	I	x	x
Ae148	pois	Suède			I	x	x
Ae133		Norvège				x	x
<u>Etats-Unis</u>							
Ae109	pois	USA	PVAFB	nc	III	x	
Ae110	pois	USA	PVAFB	nc	I	x	x
Ae112	haricot	USA	VAB	nc	NT	x	x
Ae114	luzerne	USA	VAF	nc	NT	x	x
Ae172	pois	USA	PVA	nc	I	x	x
Ae173	haricot	USA	PVAF	nc	III	x	x

Autres pays

Ae154	luzerne	Australie	VAB	nc	NT	x	x
Ae143	pois	Japon				x	x
Ae139	pois	N-Zélande	PVAF	nc	IV	x	x

Légende

^aLes isolats marqués en gras ont été analysés par les deux combinaisons d'amorces AFLP.

^bNA : non agressifs dans les conditions du test (cf. Chapitre 2 partie II)

^cNT : non testés

^dnc : non classés

Tableau 3.2 Protocole AFLP

(modifié de Rosendahl et Taylor, 1997 et AFLP™ Microbial fingerprinting Protocol, PE Applied Biosystems, 1998)

1. RESTRICTION

4	μL	ADN (12.5 ng.μL⁻¹)
2.5	μL	Tampon RL5X
0.1	μL	EcoR1 (20 U .μL ⁻¹)
0.4	μL	Mse1 (5 U .μL ⁻¹)
5.5	μL	H ₂ O ultra-pure

12.5 μL au total

Incubation à 37°C pendant 2

2. LIGATION

2.5	μL	Tampon RL5 X
1	μL	adaptateur EcoR1 à 5 pmol .μL ⁻¹
1	μL	adaptateur Mse1 à 50 pmol .μL ⁻¹
1	μL	ATP à 10 mM
0.34	μL	ligase à 3 U.μL ⁻¹
4.6	μL	H ₂ O ultrapure

12.5 μL au total

+ 12.5 μL de la réaction de digestion

**Incubation à 16° pendant la nuit,
ou 37 °C pendant 3 heures**

Dilution 1:1 avec TE_{0.1} ou H₂O ultrapure

3. PRE-AMPLIFICATION

8.6	μL	H ₂ O
2	μL	10X PCR Buffer
2	μL	amorce EcoR1 "+1" à 10 pmol .μL ⁻¹
2	μL	amorce Mse1 "+1" à 10 pmol .μL ⁻¹
1.2	μL	MgCl ₂ à 25 mM
2	μL	dNTP à 2 mM
0.2	μL	Taq à 5 U.μL ⁻¹ (en dernier)

18 μL au total

**+ 2 μL de restriction-ligation
diluée**

Programme "PREAMP"

2 min. à 72°C

20 sec. à 94 °

30 sec. à 56°C

2 min. à 72°C

20 cycles

4. AMPLIFICATION

9.1	μL	H ₂ O ultrapure
0.5	μL	amorce Mse1 "+3" à 10 pmol.μL ⁻¹
0.1	μL	amorce EcoR1 "+3" à 10 pmol.μL ⁻¹
2	μL	dNTP à 2 mM
2	μL	10X PCR Buffer
1.2	μL	MgCl ₂ à 25 mM
0.1	μL	Taq à 5 U.μL ⁻¹

15 μL au total

+ 5 μL de préamplifiat dilué

Programme "AFLP5"

2 min. à 94 °C

20 sec. à 94 °C

30 sec. à 65 °C (-0.7 °C/ cycle)

60 sec. à 72 °C

20 sec. à 94°C

30 sec. à 56°C

60 sec. à 72°C

13 cycles

22 cycles

Tableau 3.3 Séquences des oligonucléotides utilisés en AFLP

1. Ligation

Adaptateurs

7.1.1.3 Eco-A

5'CTCGTAGACTGCGTACC 3'
3' CTGACGCATGGTTAA 5'

7.1.1.4

7.1.1.5 Mse-A

5' GACGATGAGTCCTGAG 3'
3' TACTCAGGACTCAT 5'

2. Préamplification non sélective

7.1.1.6

7.1.1.7 Amorces Eco+1

7.1.1.8 Eco+A

AGACTGCGTACCAATTCA

Eco+C

AGACTGCGTACCAATTCC

Amorces Mse+1

Mse+C

GATGAGTCCTGAGTAAC

Mse+G

GATGAGTCCTGAGTAAG

7.1.1.9

7.1.1.11

7.1.1.10 3. Amplification sélective

7.1.1.12 Amorces Eco+3 (marquées)

Eco+AAT (6-Fam, bleu)

Fam-AGACTGCGTACCAATTCAAT

Eco+ACC (Ned, jaune)

Ned-AGACTGCGTACCAATTCACC

Eco+CCA (Hex, vert)

Hex-AGACTGCGTACCAATTCCCA

7.1.1.13 Amorces Mse+3

7.1.1.14 Mse+CTG

GATGAGTCCTGAGTAACTG

7.1.1.15 Mse+CGT

GATGAGTCCTGAGTAACGT

7.1.1.16 Mse+CAT

GATGAGTCCTGAGTAACAT

Mse+GCA

GATGAGTCCTGAGTAAGCA

NB: L'ABI Prism 310 de l'UMR BiO3P est doté uniquement du filtre virtuel D :

- 6-Fam (bleu)
- Hex (vert)
- Ned (jaune)
- ROX (rouge) = marqueur

Toutes les amorces sont fournies par Life Technologies, sauf l'amorce-Ned, disponible seulement chez Perkin-Elmer.

Tableau 3.4 Comparaison des deux combinaisons d'amorces :
Nombres totaux de bandes, nombres de bandes par isolat,
fréquences

Combinaisons d'amorces	Isolats <i>d'A.euteiches</i> testés	Nombre de bandes ^a		Nombre bandes/isolat (plage)	Fréquences de bandes (<i>A.euteiches</i>)	Loci uniques	Loci de fréquences 0.2-0.8
		TOTAL ^b	<i>A.euteiches</i>				
Eco+AAT /Mse+CTG	78	195	191	32.63 (8-75)	0.012 à 0.846	25	55
Eco+ACC /Mse+CGT	37	76	67	9.81 (3-23)	0.026 à 0.552	16	17

^a Toutes les bandes sont polymorphes.

^b *Aphanomyces euteiches* et *Phytophthora infestans*

Tableau 3.5 Diversité génotypique (indices de Shannon) chez les phénotypes de virulence (66 isolats d'*A.euteiches*)

Phénotype de virulence	H'_j				H'_{pop}^b	H'_{sp}^c	H'_{pop}/H'_{sp}	G'_{st}^d
	PV	PVA	PVAF	PVAFB				
Moyennes^a	0,396 <i>b</i>	0,491 <i>a</i>	0,410 <i>a</i>	0,478 <i>a</i>	0,444	0,475	0,935	0,066

^a Ces valeurs sont la moyenne sur l'ensemble des 186 loci. Celles qui sont flanquées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test Newman-Keuls ($P=0.05$) sur valeurs transformées par $\sin^{-1}(x)^{1/2}$)

^b H'_{pop} est calculé sur les 4 groupes PV, PVA, PVAF et PVAFB

^c H'_{sp} est calculé sur les 66 isolats

^d $G'_{st} = 1 - (H'_{pop}/H'_{sp})$

Tableau 3.6 Diversité génotypique (indices de Shannon) parmi les pathotypes (62 isolats d'*A.euteiches*)

Pathotypes	H'_j			H'_{pop}^b	H'_{sp}^c	H'_{pop}/H'_{sp}	G'_{st}^d
	A	B	C+D				
Moyennes^a	0,382 <i>c</i>	0,449 <i>b</i>	0,498 <i>a</i>	0,443	0,476	0,896	0,104

^a Ces valeurs sont la moyenne sur l'ensemble des 181 loci. Celles qui sont flanquées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test Newman-Keuls ($P=0.05$))

^b H'_{pop} est calculé sur les 3 groupes A, B et C+D

^c H'_{sp} est calculé sur les 62 isolats

^d $G'_{st} = 1 - (H'_{pop}/H'_{sp})$

Tableaux 3.7 Différenciation génotypique estimée par la statistique θ (Weir, 1996), entre groupes d'isolats d'*A.euteiches* définis par leur degré de spécificité d'hôte. Analyse réalisée sur:

a : 4 phénotypes de virulence (186 loci)

b : phénotypes de virulence après regroupement de PV et PVA (186 loci)

c : pathotypes (181 loci)

a

	PV (4 isolats)		PVA (13 isolats)		PVAF (43 isolats)		PVAFB (6 isolats)	
	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a
PV	*	*						
PVA	-0.009	0.48	*	*				
PVAF	0.085	0.30	0.028	0.69	*	*		
PVAFB	-0.005	0.65	0.023	0.41	0.041	1.00	*	*

b

	PV+ PVA (17 isolats)		PVAF (43 isolats)		PVAFB (6 isolats)	
	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a
PV+PVA	*	*				
PVAF	0.034	0.02	*	*		
PVAFB	0.022	0.46	0.041	1.00	*	*

c

	A (9 isolats)		B (44 isolats)		C et D (9 isolats)	
	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a
Pathotype A	*	*				
Pathotype B	0.006	0.31	*	*		
Pathotypes C et D	0.012	0.73	0.053	0.20	*	*

^a L'hypothèse H_0 = "il n'y a pas de différenciation entre les populations" est testée en comparant le θ des populations observées à ceux de jeux de données dont les individus ont été mélangés au hasard. Ici, les données réelles ont été comparées à 200 jeux de données randomisés. Les P marqués en gras sont significatifs au seuil 0.05.

Tableau 3.8 Diversité génotypique (indice de Shannon) dans les populations françaises d' *A.euteiches* en fonction de leur regroupement géographique: parcelle, bassin de production, collection française

	H' _j					Collection français e	H' _a ^{pop}	H' _{sp} ^b	H' _{pop} /H' _{sp}	G' _{st} ^c
	Fretoy	Cléguérec	Bretagne	EPB	Centre					
Moyennes^a	0,253 <i>c</i>	0,255 <i>c</i>	0,383 <i>b</i>	0,423 <i>a</i>	0,490 <i>a</i>	0,449 <i>a</i>	0,432	0,50 5	0,77 9	0,22 1

^aLes moyennes ont été calculées sur l'ensemble des 191 loci. Les valeurs marquées de la même lettre ne sont pas significativement différentes (test Newman-Keuls ($P=0.05$) sur valeurs transformées par $\sin^{-1}(x)^{1/2}$)

^aH'_{pop}= calculé sur les trois populations "EPB" (34 isolats), "Bretagne" (17 isolats), "Centre" (5 isolats)

^b H'_{sp} = calculé sur les 78 isolats d'*Aphanomyces euteiches*

^c G'_{st}= 1- (H'_{pop}/H'_{sp})

Tableaux 3.9 Différenciation génotypique estimée par la statistique θ (Weir, 1996), entre groupes d'isolats d'*A.euteiches* d'origines géographiques différentes :

a : entre trois bassins de production français (178 loci)

b : entre parcelles, et à l'intérieur de bassin (178 loci)

a

	EPB (34 isolats)		Bretagne (17 isolats)		Centre (5 isolats)	
	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a
EPB	*	*				
Bretagne	0.009	<i>0.17</i>	*	*		
Centre	0.093	<i>0.52</i>	0.094	<i>0.40</i>	*	*

b

	Fretoy		autres isolats EPB		Cleguerec		autres isolats Bretagne		Centre	
	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a	θ	P^a
SOL	*	*								
autres EPB	0.087	<i>1.00</i>	*	*						
BRE	0.066	<i>0.68</i>	0.042	<i>0.01</i>	*	*				
autres Bretagne	0.191	<i>0.02</i>	-0.015	<i>1.00</i>	0.109	<i>0.02</i>	*	*		
Centre	0.234	<i>1.00</i>	0.015	<i>1.00</i>	0.183	<i><0.01</i>	-0.058	<i>0.99</i>	*	*

^aLes valeurs de P sont obtenues après comparaison du θ observé avec 200 randomisations. Les valeurs marquées en gras sont significatives au seuil 0.05.

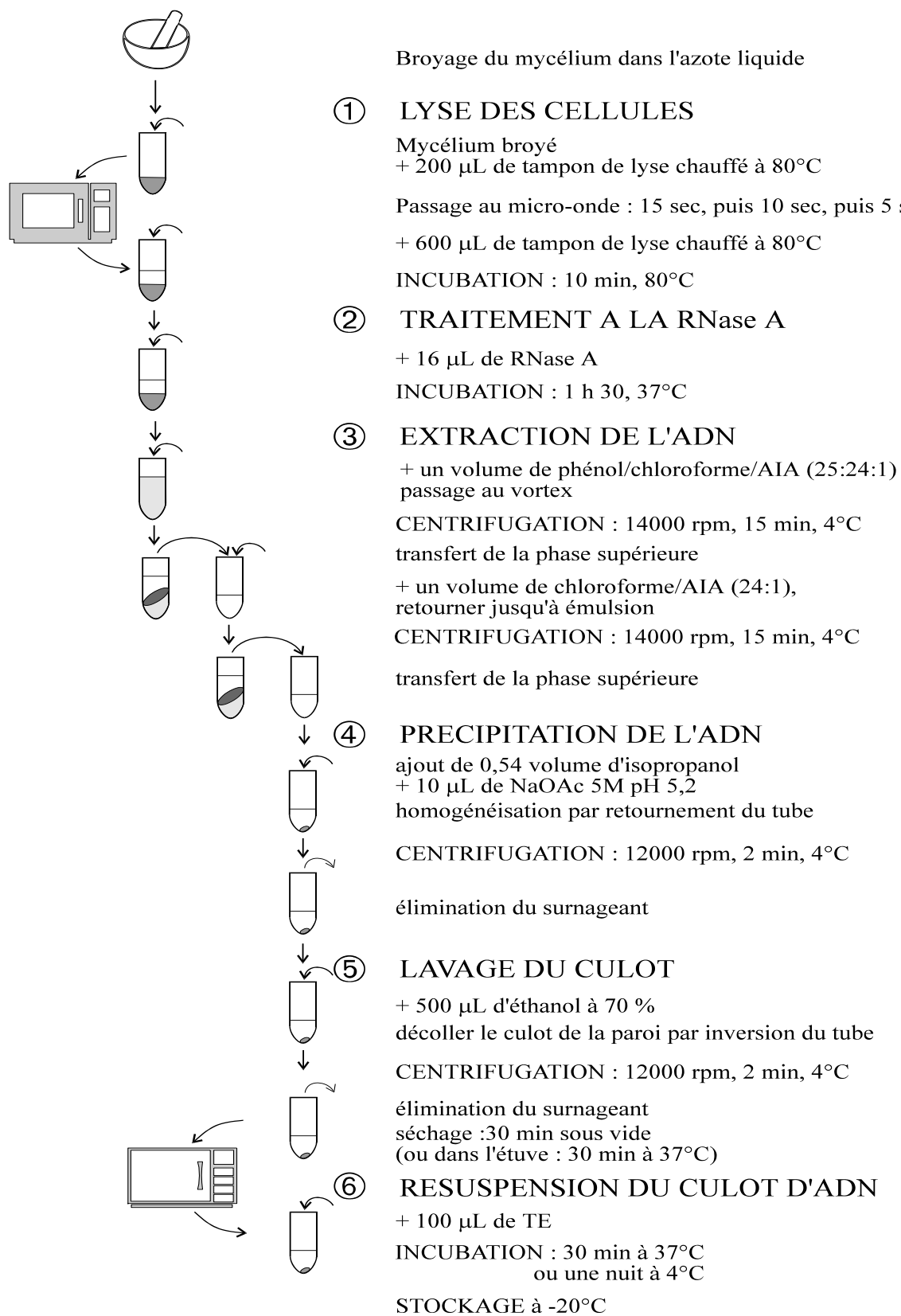


Figure 3.1 Protocole d'extraction d'ADN
 (d'après Goodwin et Lee (1993))

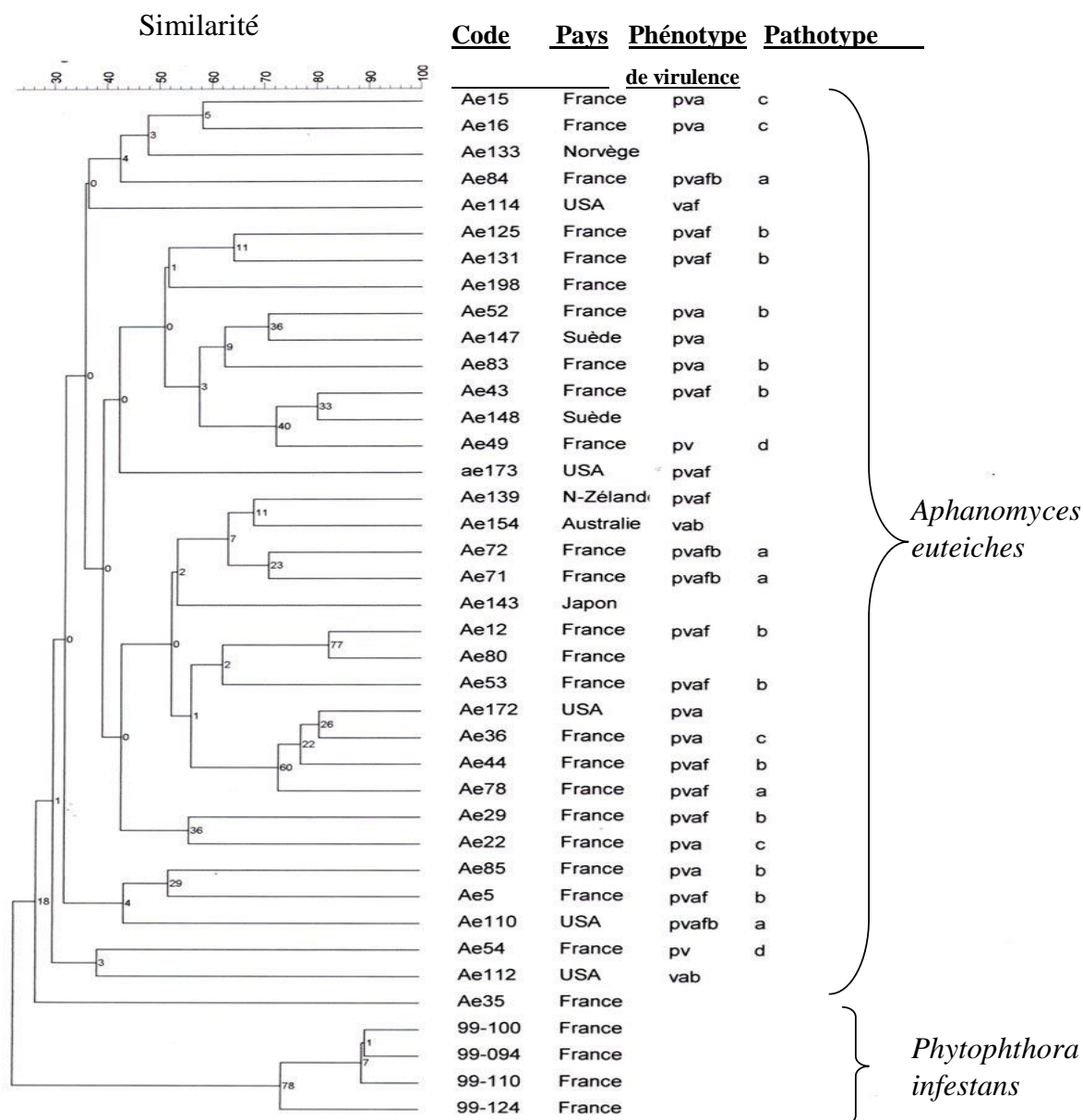


Figure 3.2 Phénogramme montrant les similarités génétiques entre isolats d' *Aphanomyces euteiches* de différentes origines géographiques et caractéristiques de pathogénicité.

Analyse AFLP à 2 combinaisons d'amorces ; coefficient de similarité= "simple matching coefficient" (les chiffres sur chaque noeud sont les indices de bootstrap obtenus après 10 000 permutations)

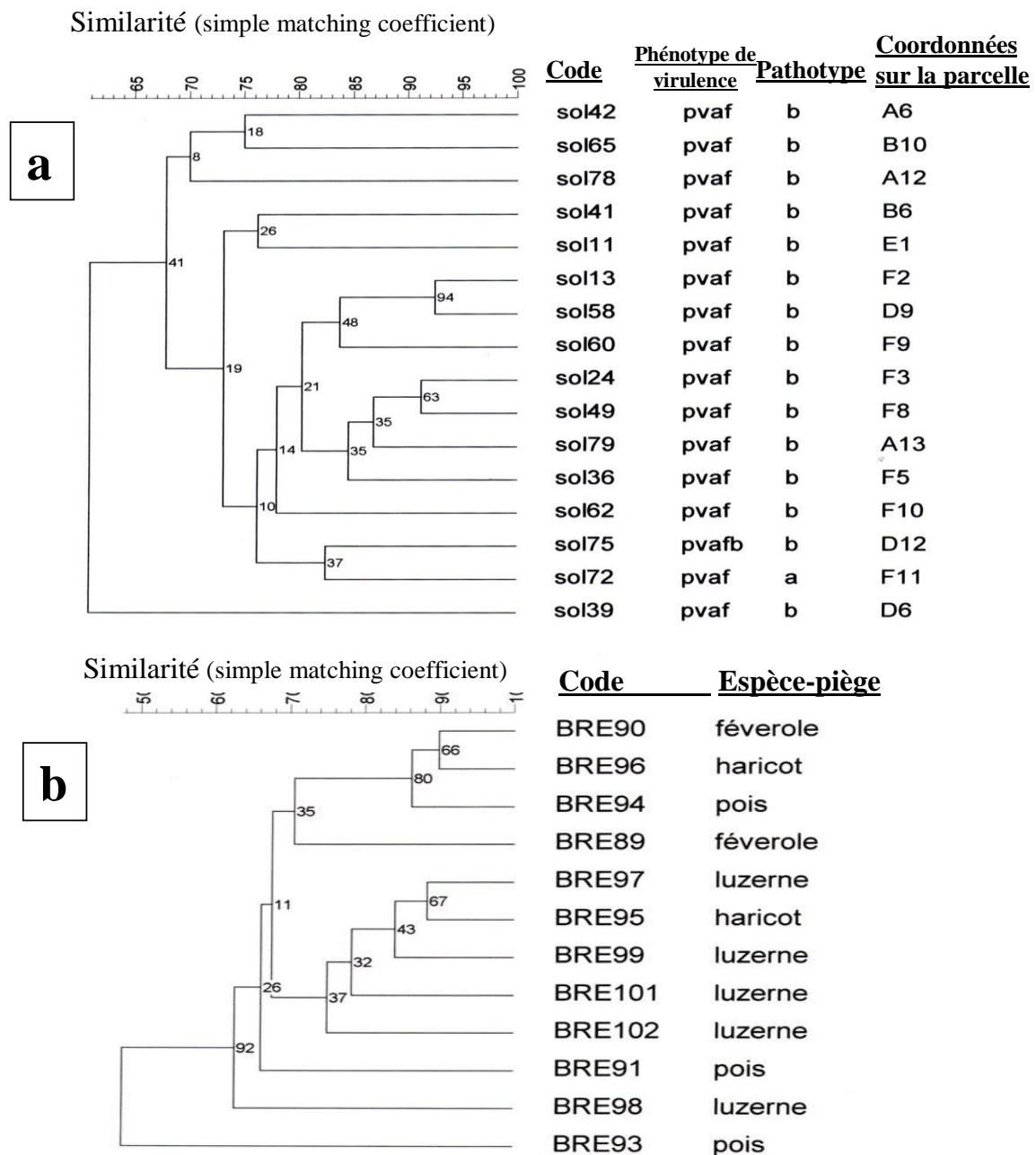


Figure 3.3 Phénogramme des similarités génétiques entre isolats
a: du sol de Clégüérec (BRE)
b: de la plateforme du Frétoy (SOL)

Données AFLP (Eco+AAT/Mse+CTG) analysées par le "simple matching coefficient". Les indices de bootstraps sont obtenus après 10000 permutations

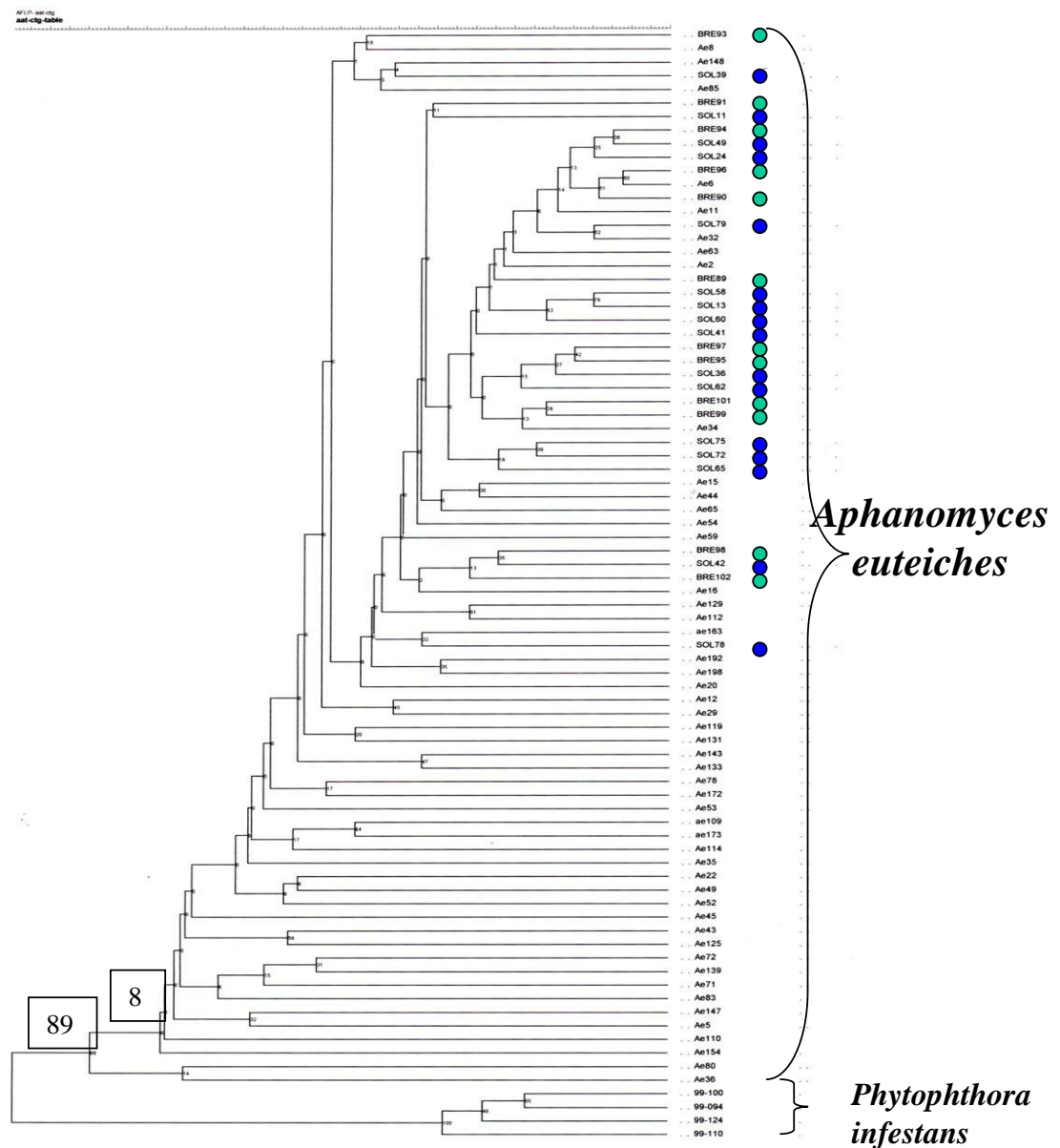


Figure 3.4 Phénogramme des similarités génétiques entre isolats d'origine parcellaire (Fretoy=SOL[●], Cléguérec= BRE[●]) et isolats de la collection nationale et internationale d' *A. euteiches*

(AFLP, combinaison Eco+AAT/Mse+CTG - similarité = simple matching coefficient - 10000 bootstraps)

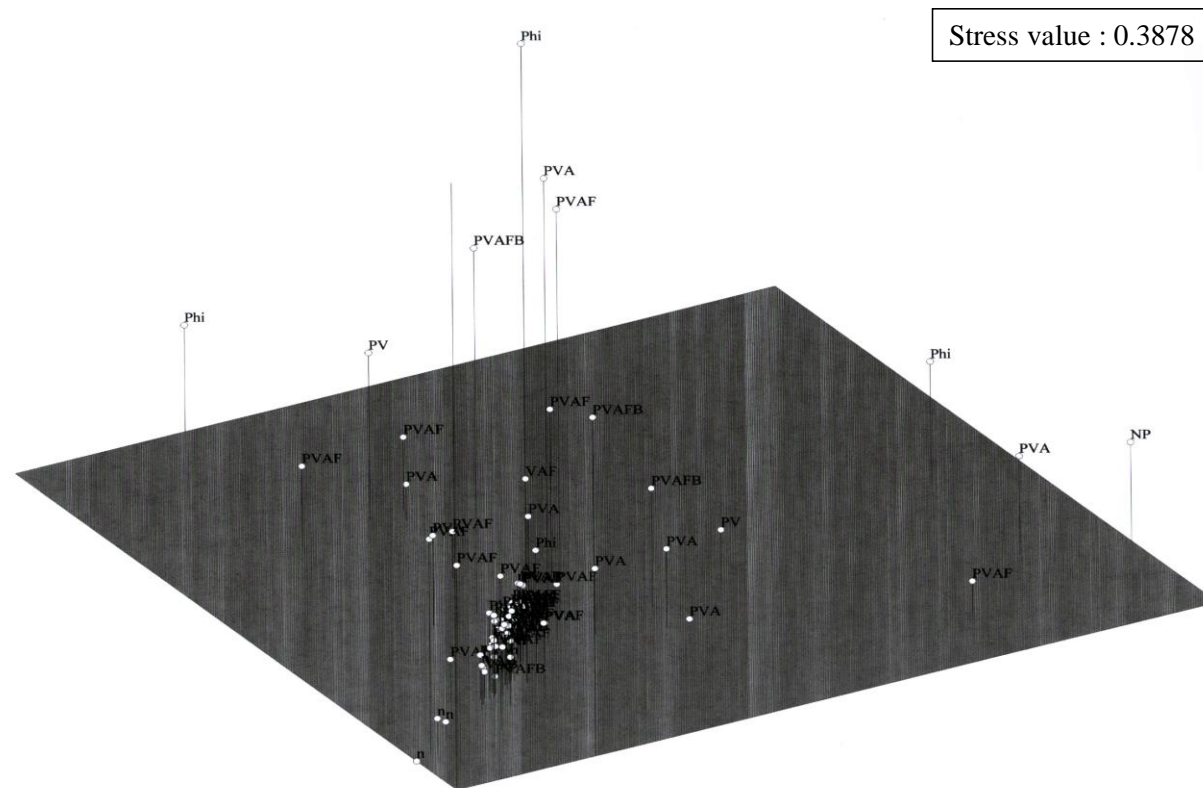


Figure 3.5 Représentation multidimensionnelle non métrique (nMDS) des distances génétiques entre isolats d' *Aphanomyces euteiches*, selon leur phénotype de virulence

NP= non pathogène PV= pois-vesce ; PVA= pois-vesce-luzerne; PVAF = pois-vesce-luzerne-féverole ; PVAFB= polyphage; Phi = *Phytophthora infestans*

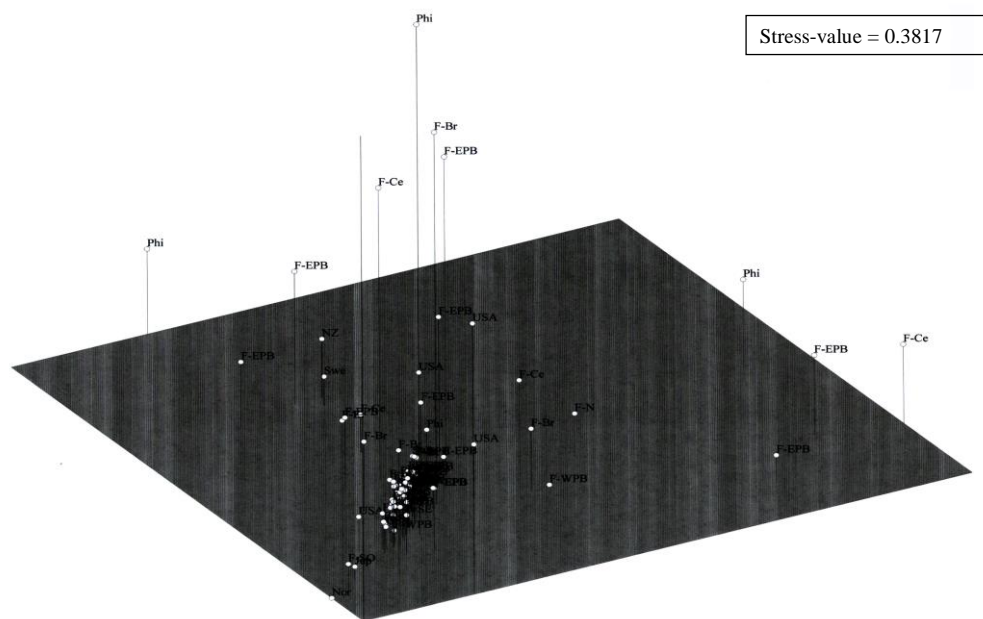


Figure 3.6 Représentation multidimensionnelle non métrique (nMDS) des distances génétiques entre isolats d' *Aphanomyces euteiches*, repérés selon leur origine géographique
 F-EPB= Est Bassin Parisien; F-WPB=Ouest Bassin Parisien; F-Br= Bretagne; F-Ce= Centre; F-N= Nord; F-SO= Sud-Ouest; Swe=Suède; Nor=Norvège; NZ= N-Zélande; Jap=Japan; Phi = *Phytophthora infestans*

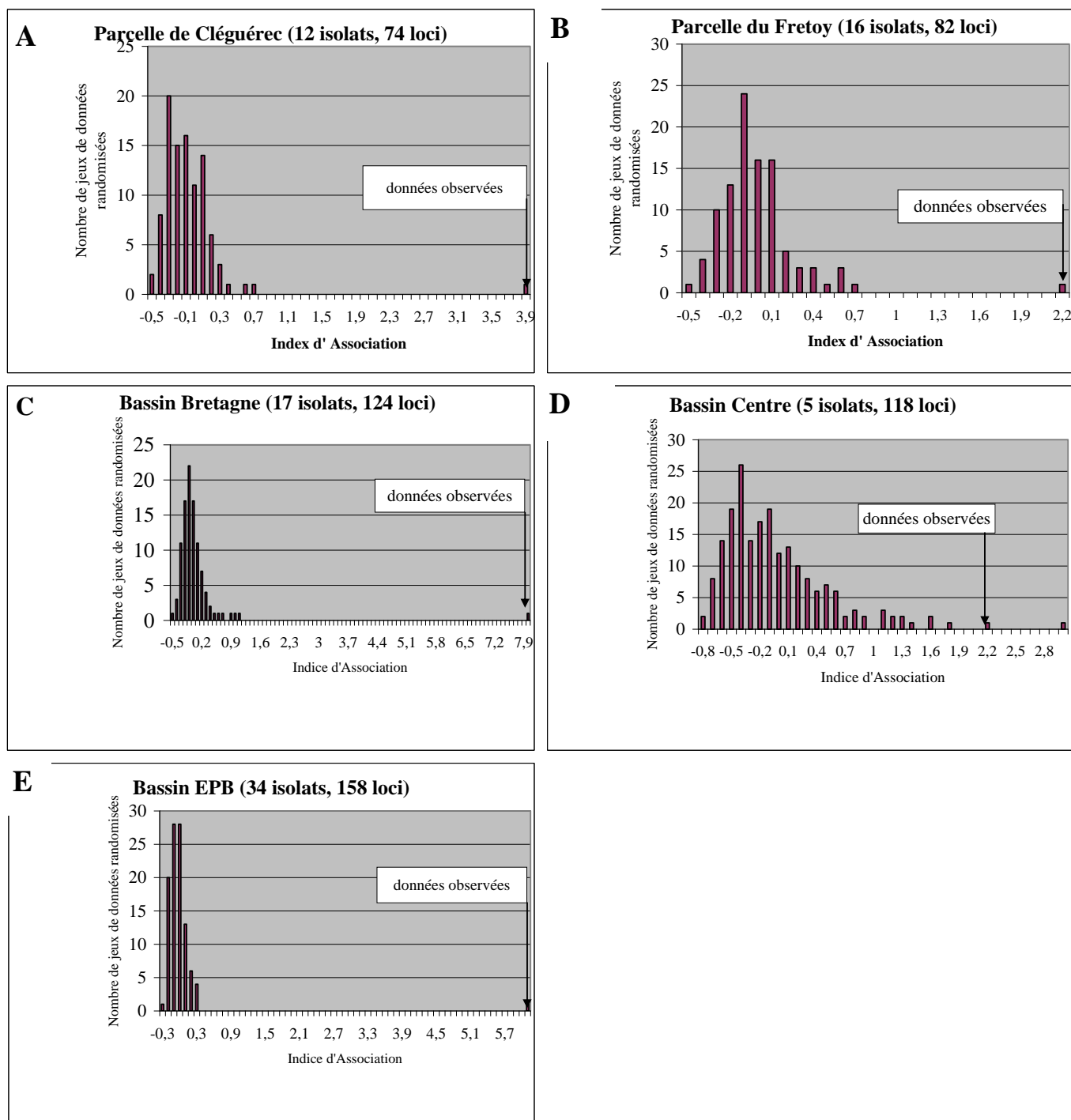


Figure 3.7 Structure de populations d'*A.euteiches* à l'échelle du bassin de production et de la parcelle, estimée par l'Indice d'Association (I_a)- Données observées, comparées à 200 jeux de données artificiellement recombinaés

Conclusion générale et perspectives

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail présenté dans ce mémoire avait pour objectif d'étudier la diversité du pouvoir pathogène et la structure génétique des populations françaises d' *Aphanomyces euteiches*, agent causal d'une maladie du pois apparue soudainement en France, et provoquant de gros dégâts. L'absence d'information dans ces domaines rendait indispensable cette étude afin de mieux connaître l'épidémiologie du parasite, et contribuer au choix de méthodes de lutte efficaces et durables. C'est à notre connaissance la première étude sur cet agent pathogène rassemblant des populations issues des principaux continents touchés par la maladie (Europe, Amérique, Océanie). L'utilisation de gammes différentielles originales nous a permis d'étudier la spécificité d'hôte, puis la virulence sur pois, des populations françaises, comparativement à des souches de référence étrangères. Le développement de marqueurs AFLP a également permis d'étudier la structure des populations d' *A.euteiches*, à différentes échelles.

Cette discussion générale va permettre de reprendre un certain nombre de questions fondamentales, posées en introduction de ce mémoire :

- d'où vient l'agent pathogène ? Cette brusque apparition de maladie est-elle due à une récente introduction d' *A.euteiches* en France ?
- quel est le degré de spécialisation de ce champignon, aussi bien par rapport au pois que par rapport à différentes Légumineuses ?
- les populations d' *A.euteiches* sont-elles structurées par le pouvoir pathogène, par la géographie, ou par les deux à la fois ?
- quel est le mode de reproduction prédominant chez *A.euteiches* ? En fonction de la réponse à cette question, plusieurs hypothèses pourront en effet être formulées sur l'épidémiologie et la capacité d'évolution du champignon.

L'apport cognitif de cette étude est par ailleurs riche en incidences agronomiques ; nous verrons les réponses qui peuvent être apportées à deux questions importantes :

- ↳ quel est le risque potentiel de passage de la maladie sur d'autres Légumineuses cultivées, en particulier la féverole ?

↳ existe-t-il des « races », ou des groupes différant par leur caractéristiques de virulence et agressivité sur pois ? Quelles sont les conséquences en matière de sélection pour la résistance ?

1 DES AVANCÉES SUR LA CONNAISSANCE DE LA MALADIE ET L'AGENT PATHOGENE

1.1 A.euteiches est endémique en France

Les populations françaises d'*A.euteiches* sont caractérisées par une forte diversité génotypique, aux différentes échelles d'étude que nous avons abordées. Il est donc hautement improbable que la récente explosion de la maladie soit due à une introduction très récente de l'agent pathogène en France, par des isolats différents de ceux décrits par Labrousse en 1933. Si le champignon avait été introduit, par exemple en Seine-et-Marne, puis transmis aux autres régions, les mêmes génotypes auraient été identifiés dans ces différentes régions, surtout si l'on tient compte de son mode de reproduction fortement homothallique, comme nos propres résultats semblent l'indiquer. L'hypothèse la plus vraisemblable est donc que cet agent pathogène se trouve à l'état endémique en France.

1.2 Les populations françaises d'*A.euteiches* montrent une spécialisation pathogène peu élevée

Contrairement aux populations des USA ou à certains isolats australiens, les populations françaises semblent pathogéniquement peu spécialisées sur leur hôte d'origine, étant préférentiellement pathogènes sur pois, mais capables d'infecter, avec une agressivité plus ou moins marquée, deux à cinq Légumineuses. Par ailleurs, nous avons été surpris de ne trouver aucune souche pathogène et agressive sur haricot, en particulier dans les zones de rotation pois-haricot fréquentes en Bretagne. Sur pois, les populations françaises se distinguent aussi des isolats étrangers, particulièrement américains, par leur niveau d'agressivité supérieur. La plupart des isolats sont de plus capables d'attaquer toutes les sources de résistance connues actuellement, avec une agressivité moyenne à

forte, alors qu'ils n'ont jamais été confrontés jusqu'ici à ce matériel génétique. Nous aborderons plus loin les enseignements à tirer de cette situation au plan agronomique.

1.3 Les populations d' A.euteiches en France ne semblent pas structurées

• Au niveau national

Nos résultats mettent en évidence une absence de structuration de population, que ce soit par rapport à la spécialisation pathogène, ou par rapport à l'éloignement géographique.

Les différents hôtes étudiés n'induiraient donc pas de spéciation parmi les populations françaises d' *A.euteiches* : les différents phénotypes de virulence et pathotypes n'apparaissent pas génétiquement différenciés, sur la base des marqueurs AFLP utilisés ici. Ils sont par ailleurs morphologiquement similaires, ce qui est en accord avec les observations précédentes (Holub *et al.*, 1991; Malvick *et al.*, 1998), mais contraire à ce qui est connu chez d'autres champignons relativement proches, tels que *Phytophthora megasperma* (Hansen, 1987). Par ailleurs, il ne semble pas exister par ailleurs de relation entre spécificité d'hôte et virulence sur pois. **Les différents degrés de spécificité d'hôte observés ne résulteraient donc pas d'une sélection parmi plusieurs sous-populations mais plutôt d'une adaptation**, sans doute en réponse aux rotations.

L'absence de structuration spatiale est également manifeste mais plus surprenante, vu le faible pouvoir de dissémination direct d' *A.euteiches*. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce paradoxe :

- ♦ La première serait que des flux de gènes incessants entre bassins induiraient une homogénéisation constante des populations, s'opposant ainsi à leur différenciation. Les mécanismes impliqués dans ces possibles échanges semblent cependant difficiles à expliquer, on l'on ne peut que spéculer sur la nature des vecteurs susceptibles de disséminer l'inoculum régulièrement et sur de longues distances : l'homme, les oiseaux, l'eau ?

- ♦ La deuxième hypothèse, plus plausible, serait que **cette population pathogène est encore à l' "état sauvage"**, adaptée à la grande variété de ses hôtes naturels (Légumineuses sauvages et fourragères notamment), et **non encore durablement influencée par une forte pression de sélection** (culture hôte résistante ou variété résistante de pois).

Le fait que les populations ne soient pas spécialisées sur pois tend à montrer, en accord avec des travaux antérieurs d' Holub *et al.* (1991) et Malvick *et al.* (1998) que cette espèce n'est pas une culture sélective pour *A.euteiches*, tout comme la vesce commune.

- ***Les populations parcellaires sont pathogéniquement homogènes, mais génétiquement non structurées***

Il est admis que les champignons phytopathogènes telluriques se répartissent géographiquement dans le sol selon différents modes : la répartition de clones strictement territoriaux (tel *Armillaria gallica* qui se propage dans le sol par rhizomorphes d'arbre à arbre), et la répartition dispersive de clones (tel *Sclerotinia sclerotiorum*, dispersé au champ par sclérotés et ascospores) (Anderson & Kohn, 1995).

Dans le cas d'*A.euteiches*, notre étude n'a pas fait apparaître de zonation par lignées clonales, tous les génotypes étant différents dans les deux parcelles étudiées. La plateforme du Fretoy, qui présentait des différences de gravité d'attaque entre parcelles élémentaires, nous avait amené à supposer l'existence de lignées clonales d'agressivité et spécificité d'hôte différentes. En fait, les isolats parcellaires testés ont tous un comportement pathogène très similaire, et leur analyse moléculaire montre qu'il n'existe pas de liaison entre similarité génotypique et proximité géographique. Ce résultat, qui va à l'encontre de ce que Malvick et Percich (1998) ont observé aux USA, pourrait être expliqué par des différences d'expression de la maladie en fonctions de conditions environnementales particulières (réceptivité des sols, potentiel de dispersion d'inoculum lié aux caractéristiques du sol, comme l'évoque McDonald (1997)). Cette analyse mériterait donc d'être approfondie par un échantillonnage parcellaire plus équilibré et plus serré, notamment dans des situations à « foyers » typiques.

1.4 *A.euteiches* se reproduirait principalement par homothallisme, mais ...

D'après nos résultats, la structure de population apparaît marquée par une prédominance d'autofécondations, alors que la diversité génotypique observée est très importante à toutes les échelles d'étude, et que les bassins ne sont pas différenciés entre eux.

Quatre hypothèses peuvent être suggérées pour tenter d'expliquer ce paradoxe :

Hypothèse 1 : le modèle « épidémique » énoncé par Maynard Smith *et al.* (1993) chez les bactéries, et repris par Milgroom (1996) sur les champignons. Ce modèle conjugue une recombinaison plus ou moins fréquente à des phases épidémiques asexuées nombreuses. Cette hypothèse a été évoquée pour expliquer la structure de population des deux sous-espèces sympatriques mises en évidence chez *Botrytis cinerea* (Brygoo *et al.*, 1998): le degré de diversité dans chaque sous-espèce est très fort (avec autant de génotypes que d'isolats), alors que le pourcentage de paires de loci en déséquilibre de liaison conduit à rejeter l'hypothèse de recombinaison au hasard. Rosewich *et al.* (1999) évoquent pour leur part ce modèle dans l'explication de la structure des populations de *Rhizoctonia solani* AG1 IA au Texas.

Chez *A.euteiches*, ce modèle impliquerait l'existence d'un unique cycle sexué par an et de nombreux cycles asexués, donc de contaminations secondaires, soit par contact de racine à racine, soit par sporulations secondaires à partir des racines malades. Cette hypothèse, déjà évoquée par Pfender & Hagedorn (1983), pourrait être testée en essayant de faire sporuler le champignon à partir de tissus racinaires infectés, mais elle semble difficilement compatible avec la faible durée d'activité végétative d'*A.euteiches* dans les racines rapportée par Kjølner & Rosendahl (1998).

Hypothèse 2 : Les recombinaisons hétérothalliques ne se produiraient que sur certains hôtes, et en particulier pas sur pois. Avec l'intensification de la culture du pois, les populations tendraient donc vers l'autogamie ? Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'appliquer plusieurs monocultures (pois, mais aussi autres espèces hôtes) à un sol naturellement infesté par *A.euteiches* en conditions semi-contrôlées, et de suivre l'évolution de la structure de sa population, ainsi que l'éventuelle apparition d'isolats virulents ou plus agressifs.

Hypothèse 3 : Seuls quelques isolats parmi l'ensemble de la population, ou quelques oospores parmi l'ensemble des oospores formées seraient impliqués dans le déclenchement de la maladie. Cette hypothèse, pour être validée, nécessiterait d'étudier le mode d'infection de la plante, afin d'estimer notamment le nombre de points d'infection, l'existence éventuelle de sites de pénétration préférentiels selon les individus (attaquent-ils tous de la même façon, ou certains ont-ils des sites spécifiques d'infection, restant dans les racines, tandis que d'autres montent jusqu'à l'épicotyle ?). Elle pourrait être testée aussi par la comparaison d'individus isolés d'épicotyle de pois (la majeure partie de notre collection est d'ailleurs de ce type) et d'individus isolés de racines.

En étudiant plusieurs descendance mono-oosporées, Shang *et al.* (2000c) ont montré qu'aucune variation n'était générée par l'autofécondation. En revanche, la variabilité existant dans une oospore issue du champ (et non issue d'une monozoospore), n'a à notre connaissance jamais été étudiée.

Hypothèse 4 : Le déséquilibre de liaison observé serait dû à l'existence de types sexuels, conjuguée à l'homothallisme déjà existant. Cette hypothèse de bithallisme a été évoquée précédemment par Shang *et al.* (2000a), comparant le cas d' *A.euteiches* à celui de *Phytophthora sojae* (Tyler *et al.*, 1995; Whisson *et al.*, 1994).

Cette hypothèse pourrait être testée en vérifiant par exemple si tous les loci sont en déséquilibre de liaison, ou si seulement certains d'entre eux sont fortement déséquilibrés (Enjalbert, communication personnelle 2001). Il faudrait pour cela accéder aux fréquences alléliques par des estimateurs non biaisés, ou travailler sur des marqueurs moléculaires codominants (microsatellites, RFLP, séquences de gènes).

La question du mode de reproduction d'*A.euteiches* est donc loin d'être résolue. Son élucidation nécessite un effort de recherche important, après la hiérarchisation de ces hypothèses. Nous verrons dans notre partie "Perspectives" quelle peut être notre contribution à cette recherche.

2 LES RETOMBEES AGRONOMIQUES

2.1 Pour la gestion des rotations

Comme nous l'avons dit précédemment, la majorité des isolats français d' *A.euteiches* issus de pois attaquent aussi la vesce commune et la luzerne. Les rotations culturales incluant ces deux espèces présentent donc, à plus ou moins long terme, des risques réels de développement de la maladie. La vesce sauvage, souvent présente en bordure des champs cultivés, constitue également un réservoir potentiel pour l'agent pathogène.

Il a d'autre part été démontré qu'une partie des populations, même faible (10% de la collection étudiée), a la potentialité d'infecter et de provoquer la maladie sur féverole. Remplacer systématiquement le pois par la féverole en zones infestées constitue donc également un risque qu'il conviendra de prendre en compte dans la gestion des rotations culturales.

2.2 Pour la lutte génétique

2.2.1 Des sources de résistance intéressantes

Cette étude a permis d'évaluer en conditions contrôlées le comportement des sources de résistance américaines vis-à-vis des populations françaises. Toutes ces lignées sont attaquées, mais certaines présentent un niveau relativement intéressant de résistance partielle au stade jeune plante, telles que PI180693, mais aussi la lignée 552, sélectionnée par ET Gritton, et 90-2131, sélectionnée par JM Kraft. Ces trois lignées ont également confirmé leur intérêt au stade adulte en conditions naturelles (M. Duparque, communications personnelles 1998, 1999, 2000), et semblent être les meilleures sources de résistance actuellement connues. Elles sont d'ailleurs intégrées aujourd'hui dans certains programmes de sélection.

2.2.2 Sélection variétale pour la résistance

L'information apportée par cette étude selon laquelle les populations françaises d' *A.euteiches* apparaissent plus agressives que les isolats d'autres pays, et ne sont **pas différenciées selon les régions en terme de virulence sur pois**, est intéressante pour le sélectionneur : elle signifie en effet que les programmes de sélection variétale peuvent être menés sur peu de sites, sans danger apparent de sélectionner une lignée qui ne serait pas résistante dans d'autres régions.

La proposition d'un test de criblage variétal en conditions semi-controlées, directement dérivé de ce travail, constitue également un apport non négligeable pour le progrès de la sélection.

3 UN NOUVEAU CHAMP D'INVESTIGATIONS TRES OUVERT

Cette étude donne une photographie des populations françaises d'*A.euteiches* entre 1995 et 1998, une période relativement proche du début de l'épidémie.

De grandes questions restent maintenant posées, d'une part sur l'apparition éventuelle de nouveaux bassins de maladie, et sur ceux déjà existants mais non échantillonnés, et d'autre part sur l'évolution de la population au cours du temps.

Ces questions, et les acquis discutés antérieurement, ouvrent également un certain nombre de perspectives de travail sur l'épidémiologie de la maladie, la résistance du pois à *A.euteiches*, ainsi que sur la génétique et l'histoire évolutive d' *A.euteiches*.

3.1 *Que manque –t-il sur la photographie actuelle de la maladie ?*

3.1.1 Les foyers de la région Rhône-Alpes n'ont pas été étudiés

La pourriture racinaire à *A.euteiches* est apparue très récemment en région Rhône-Alpes, provoquant des gros dégâts dans la plaine de Lyon en 1999, dans des parcelles irriguées de rotation pois-maïs. On ignore complètement le statut de la population responsable de ces nouveaux foyers : diffère-t-elle des autres bassins touchés (Bassin Parisien, notamment) en terme de spécificité d'hôte, de virulence de pois? Cette population pathogène s'est-elle exprimée suite à la conjonction de conditions favorables, ou a-t-elle été introduite ? La réponse à ces questions pourrait certainement apporter un éclairage complémentaire aux résultats de notre étude.

3.1.2 On ne sait pas si A.euteiches est présent dans des zones non cultivées en pois

La collection que nous avons caractérisée est constituée d'isolats évoluant dans un contexte agronomique marqué par les grandes cultures (blé-colza-orge-betterave dans le Bassin Parisien, pois-maïs-colza-tournesol dans le Centre) ou les cultures légumières (pois, haricot, épinard en Bretagne, en Eure-et-Loir).

Des prospections dans des zones de polyculture-élevage, voire en zones de prairie permanente ou semi-permanente, nous permettraient de savoir si le champignon est présent, et si les caractéristiques pathogènes de ces souches sont proches de celles de cette étude.

L'étude de la structuration de populations dans des contextes semi-naturels permettrait de mieux reconstituer l'histoire des populations d' *A.euteiches*. L'existence dans ces contextes de populations polyphages pourrait indiquer que la culture du pois est en fait en train de sélectionner la population vers un type agressif et de plus en plus spécialisé sur cette culture. Alternativement, si ces populations possédaient toutes le même spectre d'hôte, le développement récent d' *A.euteiches* sur pois pourrait peut-être s'expliquer par l'emploi actuel de cultivars sélectionnés pour leur productivité mais très peu rustiques et beaucoup plus sensibles à la maladie que les variétés traditionnelles ou sauvages.

3.2 *Comment les populations d' A.euteiches risquent-elles d'évoluer en France ?*

3.2.1 A quel rythme ?

Cette étude ne nous a pas permis d'évaluer l'évolution de la population au cours du temps : le polymorphisme observé se maintient-il sur plusieurs années, y a-t-il apparition et disparition rapide de génotypes chaque saison ? Pour étudier l'évolution annuelle des populations, il serait nécessaire de travailler sur un petit nombre de sites bien caractérisés.

La question reste entière sur le **temps nécessaire à l'agent pathogène pour s'adapter** à une nouvelle culture, et sur le ou les mécanismes d'adaptation.

Le temps d'adaptation peut être évalué par l'application de plusieurs cycles de monoculture d'espèces hôtes résistants, telles que la féverole, en conditions semi-contrôlées. Ce volet est d'ailleurs en cours d'étude à l'INRA de Rennes.

Le mécanisme d'adaptation du champignon peut dépendre du nombre de générations sexuées par an, de sa capacité de reproduction allogame, ce qui peut être étudié par les croisements de souches, à l'aide de la technique de Shang (Shang *et al.*, 2000a; Shang *et al.*, 2000b). L'étude de la possibilité pour le champignon de produire un ou plusieurs cycles de formation d'oospores, sans dormance obligatoire des oospores, est également envisageable. Estimer le nombre réel de générations sexuées dans la nature s'avère autrement plus difficile.

3.2.2 Vers quelle situation, dans 5 ou 10 ans ?

Cette étude a été délibérément axée sur le problème *Aphanomyces* du pois, et l'essentiel des isolats de la collection française ont donc été piégés sur cette culture. Elle serait particulièrement intéressante à reconduire dans 5 ou 10 ans, sur la base d'un échantillonnage plus équilibré entre régions, afin de comparer les structures de population entre parcelles-pois, et de parcelles-féverole par exemple.

Cette étude permettrait de vérifier si les bassins se sont différenciés les uns des autres suite aux différences de rotation, si les populations intra-bassins sont plus structurées, mais également s'il y a apparition de phénotypes attaquant la féverole au champ.

3.3 Approfondir les connaissances épidémiologiques sur la maladie

3.3.1 Par une enquête exhaustive sur la répartition de la maladie

L'échantillonnage systématique de toutes les régions productrices de pois permettrait d'avoir tout d'abord une idée plus précise de l'infestation réelle des sols en *A.euteiches*. Une telle opération a évidemment des contraintes et n'est envisageable qu'avec l'appui des différents Instituts techniques concernés (Service de Protection des Végétaux, Institut Technique des Céréales et des Fourrages, Chambres d'Agriculture).

3.3.2 Par un suivi de la dynamique de l'inoculum

L'étude que nous avons réalisée a porté sur le volet qualitatif de l'inoculum. Il faudrait à présent pouvoir aborder le volet quantitatif de l'inoculum dans les sols. Pour aller plus loin dans la caractérisation des foyers au champ, il faudrait disposer d'une méthode de quantification d'*A.euteiches* dans le sol. Vandemark *et al.* (2000), par utilisation d'un marqueur SCAR, ont réussi

à détecter *A.euteiches* dans la plante et dans le sol. Cette technique pourrait être adaptée à la PCR quantitative, et être utilisée pour quantifier le pathogène à différentes profondeurs dans le sol, et suivre l'évolution de la densité d'inoculum.

Cette quantification de l'agent pathogène permettrait ainsi de suivre l'effet des différentes espèces hôtes ou non-hôtes (Légumineuses mais aussi avoine, moutarde,...) sur la densité d'inoculum présent dans les sols.

3.3.3 Par une meilleure connaissance des hôtes potentiels d' *A.euteiches*

Pour cela, une enquête devrait être menée pour mettre en évidence les autres Légumineuses, fourragères mais également sauvages (trèfle, lotier, minette, sainfoin, etc...), présentes dans les rotations. Des tests biologiques de spécificité d'hôte seraient ensuite à mener sur les espèces signalées par l'enquête, pour savoir si *A.euteiches* est capable de les infecter et de renouveler son inoculum.

3.3.4 Par l'étude des autres composantes du potentiel infectieux

Les différences de niveaux de réceptivité des sols entre régions plus ou moins touchées par la maladie pourraient être recherchées, et leur origine (biotique ou abiotique) analysée. Un tel programme implique un énorme investissement matériel et humain, sur le long terme.

3.4 Améliorer la résistance du pois à *A.euteiches*

Pour progresser dans la recherche de résistance à *A.euteiches*, il faudrait d'une part cribler du matériel génétique non encore évalué (lignées d'Europe Orientale, de Chine, du Proche-Orient ?), pour **trouver des géniteurs de niveau de résistance plus élevé**.

Il faudrait d'autre part **cumuler les résistances disponibles**. Cumuler les résistances implique de beaucoup mieux connaître la cinétique de leur expression au cours du développement de la plante. Cette étude a notamment montré que la résistance au stade précoce semblait corrélée à la résistance au stade adulte en conditions naturelles, mais aussi que certaines composantes de la résistance n'étaient pas pris en compte dans notre approche.

Il est donc nécessaire à présent de connaître quelles sont les étapes du cycle infectieux de l'agent pathogène affectés par la résistance de la plante, autrement dit **décomposer cette résistance** en différents facteurs ou composantes. Le typage des meilleurs génotypes sur chacune des composantes (progression de symptômes, fréquence d'attaque, quantité d'agent pathogène dans les tissus de l'hôte) permettra ensuite :

- d'avoir accès au déterminisme génétique de chacune de ses composantes (voire d'en dégager des outils de sélection par marqueurs)

Cela permettra peut-être de détecter des QTL spécifiques de race, correspondant à certaines composantes de la résistance (comme cela a été démontré dans la résistance de l'orge à *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (Qi *et al.*, 1999)).

- de croiser les meilleurs géniteurs de résistance dans chacune des composantes

Il est évident que ce volet ne peut être abordé que dans le cadre d'une étroite collaboration entre pathologistes et généticiens.

3.5 Mieux connaître la génétique du champignon

3.5.1 Comprendre la plasticité du génome d' A.euteiches

Comme cela a été dit précédemment, les différences de pouvoir pathogène que nous avons observées ne sont pas reliées aux différences observées sur l'ADN génomique, d'après nos marqueurs AFLP. Essayer de mettre en évidence l'implication d'éventuels éléments cytoplasmiques pourrait permettre d'expliquer les mécanismes d'adaptation d' *A.euteiches* aux changements d'environnement.

Des éléments transposables pourraient être impliqués dans cette adaptation (Daboussi, 1997). Bien que leur mise en évidence chez les Oomycètes soit peu documentée (F. Panabières, communication personnelle 2001), l'amplification de régions conservées avec des amorces dégénérées permettrait sans doute de tester cette hypothèse. Une collaboration avec l'équipe de F. Panabières (INRA- Antibes) serait alors à mettre en place.

3.5.2 Mieux connaître son mode de reproduction en laboratoire et dans la nature

Nous avons mis en évidence le déséquilibre de liaison multilocus existant dans les populations d'*A.euteiches*, mais nous n'avons pas pu savoir si ce déséquilibre était dû à un déficit ou à un excès d'hétérozygotes, comme cela a pu être rapporté chez *Rhizoctonia solani* (Rosewich *et al.*, 1999), et chez certaines espèces homothalliques de *Phytophthora* (Goodwin, 1997). pour avancer dans cette analyse, il nous faudrait développer des marqueurs codominants, tels que les microsatellites, de plus en plus utilisés en génétique des populations de champignons (Owen *et al.*, 1998; Udupa *et al.*, 1998; Neu *et al.*, 1999; Tenzer *et al.*, 1999). La détection de loci microsatellites nécessiterait un gros travail de criblage. Une autre alternative serait de tester le polymorphisme de microsatellites détectés chez des espèces voisines (*Saprolegnia sp.* ou *Achlya sp.* dans l'idéal, mais plus probablement *Phytophthora sp.*), en espérant que les polymorphismes soient plus importants que chez *P. cinnamomi* (Dobrowolski *et al.*, 1998).

Maîtriser les croisements de souches permettrait d'en savoir plus sur l'existence potentielle de types sexuels.

3.6 Quel est le centre de diversité d'*A.euteiches* ?

Cette absence de structuration, ce très fort polymorphisme et cette faible spécialisation sur Légumineuses nous amènent à nous demander si le centre de diversité d'*A.euteiches* ne serait pas l'Europe Méditerranéenne de l'Ouest, d'autant que le centre de diversité du pois se situe pour sa part en Asie mineure. En revanche, les populations d'*A.euteiches* sont apparemment beaucoup moins variables génétiquement au Danemark, ce qui est interprété comme une introduction récente du champignon (Rosendahl, communication personnelle 1999). Pour démêler ces hypothèses, il faudrait pouvoir comparer les populations d'*A.euteiches* de France, de Scandinavie, mais aussi d'Amérique et d'Australie, en terme de phylogénie. Le fait que les populations les plus spécialisées (sur haricot, et dans une moindre mesure sur luzerne) n'aient été décrites qu'aux Etats-Unis et en Australie pose la question du degré de convergence entre souches européennes et souches américaines et océaniques. Cependant, si les isolats néo-zélandais et les isolats européens étaient phylogénétiquement éloignés, la technique AFLP l'aurait peut-être révélé.

Pour avancer dans cette idée, une étude de phylogénie pourrait être entreprise, par comparaison des généalogies de gènes (EF-1 α , petite sous-unité mitochondriale de l'ARN ribosomal (mtSSU) (Baayen *et al.*, 2000)).

4 DES ORIENTATIONS A PRIVILEGIER

Nous sommes conscients que ces différentes perspectives nécessiteraient chacune la mobilisation d'importants moyens matériels et humains.

Dans la situation actuelle, et compte-tenu de la gravité de la maladie en France, priorité doit être donnée aux travaux susceptibles d'apporter une solution rapide et durable à ce problème. Ces travaux se situent à notre sens à deux niveaux :

- acquérir une meilleure connaissance de l'épidémiologie de la maladie prenant en compte notamment la localisation et la quantité d'inoculum, pour étudier ensuite l'effet d'autre Légumineuses et de cultures intermédiaires dans la dynamique de l'inoculum
- par une contribution à la mise en place de stratégies de gestion des résistances (décomposition de la résistance partielle) efficaces et durables, notamment en collaboration étroite avec la Station de Génétique et Amélioration des Plantes de l'INRA du Rheu.

Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarts HJM, Hakemulder LE, Van Hoef AMA, 1999. Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *International Journal of Food Microbiology* **49**, 95-102.
- Abjean-Uguen C , 1999. Etude de la variabilité morphologique, biologique et parasitaire de souches monosporées d'*Aphanomyces euteiches*. Rapport de Maîtrise "Biologie cellulaire et physiologie", Université de Bretagne Occidentale, Brest ; 19 pp.
- Agapow P-M, Burst A, 2000. MultiLocus 1.2. Logiciel d'Analyse de données. Dept of Biology, Imperial College, Silwood Park- Ascot, Berks- UK.
- Agrios GN, 1988. Plant pathology. San Diego: Third Edition/Ed. Academic Press.
- Allen RN, Letham DB, Akehurst AA, Say MM, 1987. *Aphanomyces* root rot of bean at Valla, New South Wales. *Australasian Plant Pathology* **16**, 82-4.
- Anamthawat-Jonsson K, Bragason BT, Bödvarsdóttir SK, Koebner RMD, 1999. Molecular variation in *Leymus* species and populations. *Molecular Ecology* **8**, 309-315.
- Anderson JB, Kohn LM, 1995. Clonality in soilborne, plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **33**, 369-91.
- Andrison D, 1993. Nomenclature for pathogenicity and virulence : the need for precision. *Phytopathology* **83**, 889-90.
- Arenal F, Platas G, Martin J, Salazar O, Pelaez F, 1999. Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 898-906.
- Ayers WA, Papavizas GC, Lumsden RD, 1969a. Factors affecting the pectolytic activity of *Aphanomyces euteiches* in vitro and in infected tissue. *Phytopathology* **59**, 786-91.
- Ayers WA, Papavizas GC, Lumsden RD, 1969b. Purification and properties of the endopolygalacturonase of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **59**, 925-30.
- Baayen RP, O'Donnell K, Bonants PJM, Cigelnik E, Kroon LPNM, Roebroek EJA, Waalwijk C, 2000. Gene genealogies and AFLP analyses in the *Fusarium oxysporum* complex identify monophyletic and nonmonophyletic formae speciales causing wilt and rot disease. *Phytopathology* **90**, 891-900.

- Banniza S, Sy AA, Bridge PD, Simons SA, Holderness M, 1999. Characterization of populations of *Rhizoctonia solani* in Paddy rice fields in Côte d'Ivoire. *Phytopathology* **89**, 414-20.
- Bardin M, Carlier J, Nicot PC, 1999. Genetic differentiation in the French population of *Erysiphe cichocearum*, a causal agent of powdery mildew of cucurbits. *Plant Pathology* **48**, 531-40.
- Basu PK, Brown-Crête R, Gourley CO, Haas JH, Harper FR, Lawrence CH, Seaman WL, Toms HNW, Wong SI, Zimmer RC, 1973. Prevalence and severity of diseases of processing peas in Canada, 1970-1971. *Canadian Plant Disease Survey* **53**, 49-57.
- Beghdadi A, Richard C, Dostaler D, 1992. L'*Aphanomyces euteiches* des luzernières du Québec : isolement, morphologie et variabilité de la croissance et du pouvoir pathogène. *Canadian Journal of Botany* **70**, 1903- 11.
- Benzecri J-P, ed. , 1992. "Correspondence Analysis Handbook", Marcel Dekber, New York.
- Beute MK, Lockwood JL, 1967. Pathogenic variability in *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **57**, 57-60.
- Biezen EAvd, Juwana H, Parker JE, Jones JDG, 2000. cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 895-8.
- Bødker L, Leroul N, Smedegaard-Petersen V, 1993. Influence of pea cropping history on disease severity and yield depression. *Plant Disease* **77**, 896-900.
- Bonants PJM, Weert MHd, Cooke DEL, Duncan JM, 1997. Identification of space-specific markers of *Phytophthora fragariae* with AFLP. In: "Diagnosis and identification of plant pathogens". Proceedings 4th International Symposium of the European Foundation for Plant Pathology.
- Brown AHD, Feldman MW, Nevo E, 1980. Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* **96**, 523-36.
- Brown JKM, 1996. The choice of molecular marker methods for population genetic studies of plant pathogens. *New Phytologist* **133**, 183-95.
- Brygoo Y, Caffier V, Carlier J, Fabre J-V, Fernandez D, Giraud T, Mourichon X, Neema C, Notteghem J-L, Pope C, Tharreau D, Lebrun M-H, 1998. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In "Molecular variability of fungal pathogens" (P. Bridge, Y. Couteaudier and J. Clarkson, eds.), pp.133-148. CAB International, Wallingford, New-York.
- Burnett VF, Coventry DR, Hirth JR, Greenhalgh FC, 1994. Subterranean clover decline in permanent pastures in north-eastern Victoria. *Plant and Soil* **164**, 231-41.

- Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW, 1996. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **93**, 770-3.
- Buscot F, Wipf D, Battista Cd, Munch JC, Botton B, Martin F, 1996. DNA polymorphism in morels: PCR/RFLP analysis of the ribosomal DNA spacers and microsatellite-primed PCR. *Mycological Research* **100**, 63-71.
- Bussell JD, 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* **8**, 775-89.
- Caprari C, Richter A, Bergmann C, Cicero Sl, Salvi G, Cervone Gd, 1993. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Fusarium moniliforme*. *Mycological Research* **97**, 497-505.
- Cargnoni TL, Weeden NF, 1994. A DNA marker correlated with tolerance to *Aphanomyces* root rot is tightly linked to Er-1. *Pisum Genetics* **26**, 11-2.
- Carrouée B, Verger S, Wicker E, Seguin B, 1995. Maladies du pois : enrayer l'extension d'*Aphanomyces*. *Perspectives agricoles* **207**, 55-9.
- Caten CE, 1971. Single zoospore variation in *Phytophthora infestans* and attenuation of strains in culture. *Transactions British Mycological Society* **56**, 1-7.
- Cerenius L, Söderhall K, 1985. Repeated zoospore emergence as a possible adaptation to parasitism in *Aphanomyces*. *Experimental Mycology* **9**, 259-63.
- Chan MKY, Close RC, 1987. *Aphanomyces* root rot of peas . Some pasture legumes and weeds as alternative hosts for *Aphanomyces euteiches*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **30**, 219-23.
- CISIA-CERESTA, ed. 1998. "SPAD version 3, Manuel de prise en main,". St Mandé.
- Clerc A, Manceau C, Nesme X, 1998. Comparison of Randomly Amplified Polymorphic DNA with Amplified Fragment Length Polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within Genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1180-7.
- Cruickshank IAM, 1962. Studies on phytoalexins. IV. The antimicrobial spectrum of pisatin. *Australian Journal of Biological Science* **15**, 147-59.
- Cruickshank IAM, Perrin DR, 1963. Studies on phytoalexins VI. Pisatin: the effect of some factors on its formation in *Pisum sativum* L., and the significance of pisatin in disease resistance. *Australian Journal of Biological Science* **16**, 111-28.

- Crute IR, 1986. The relationship between *Plasmodiophora brassicae* and its hosts : the application of concepts relating to variation in inter-organismal associations. In "Advances in Plant Pathology" (I. D.S. and P. H. Williams, eds.), Vol. 5. Academic Press, London.
- Cubeta MA, Vilgalys R, 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* **87**, 480-4.
- Cunningham JL, Hagedorn DJ, 1962a. Attraction of *Aphanomyces euteiches* zoospores to pea and other plant roots. *Phytopathology* **52**, 616-8.
- Cunningham JL, Hagedorn DJ, 1962b. Penetration and infection of pea roots by zoospores of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **52**, 827-34.
- Daboussi MJ, 1997. Fungal transposable elements and genome evolution. *Genetica* **100**, 253-60.
- Dandurand LM, Knudsen GR, 1993. Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. *Phytopathology* **83**, 265-70.
- Davis DW, Fritz VA, Pflieger FL, Percich JA, Malvick DK, 1995. MN144, MN313, and MN314 : garden pea lines resistant to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* Drechs. *Horticultural Science* **30**, 639-40.
- Davis DW, Shehata MA, 1989. Breeding for resistance to root-rot pathogens of peas. In "The Pea Crop" (B. Ed., ed.). PD Hebblethwaite.
- Davis DW, Shehata MA, Bissonnette HL, 1976. Minnesota 108 pea breeding line. *Horticultural Science* **11**, 434.
- de Vienne D, ed. , 1998. "Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales", pp. 1-200. INRA Editions, Paris.
- de Vienne D, Santoni S, 1998. Les principales sources de marqueurs moléculaires. In "Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales" (D. de Vienne, ed.), pp.15-47. INRA Editions, Paris.
- Deacon JW, 1996. Ecological implications of recognition events in the pre-infection stages of root pathogens. *New Phytologist* **133**, 135-45.
- Deacon JW, Saxena G, 1998. Germination triggers of zoospores cysts of *Aphanomyces euteiches* and *Phytophthora parasitica*. *Mycological research* **102**, 33-41.
- Delwiche PA, Grau CR, Holub EB, Perry JB, 1987. Characterization of *Aphanomyces euteiches* isolates recovered from alfalfa in Wisconsin. *Plant Disease* **71**, 155-61.

- Didelot D, Chaillet I, 1995. Relevance and interest of root disease prediction tests for pea crop in France. *In*: AEP (ed.) "2nd European Conference on Grain Legumes - Improving production and utilisation of grain legumes", pp. 150, Copenhagen- Denmark.
- Didelot D, Maumené C, Carrouée B, 1994. Des nécroses racinaires mieux connues. *Perspectives agricoles* **188**, 90-4.
- Divaret I, Thomas G, 1998. Use of RAPD markers to analyse the genetic variability of a collection of Brassica oleracea L. *Acta Horticulturae*, 255-62.
- Dobrowolski MP, Tommerup IC, O'Brien PA, 1998. Microsatellites in the mitochondrial genome of *Phytophthora cinnamomi* failed to provide highly polymorphic markers for population genetics. *FEMS Microbiology Letters* **163**, 243-8.
- Duparque M and Devaux-Boitel C (2001) Common root rot (*Aphanomyces euteiches*) reduces the yield of pea (*Pisum sativum*) by affecting the yield components, depending on the resistance level of the genotype. *In* : AEP (ed) "4th European Conference on Grain Legumes - Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products", pp.270-271; Cracow- Poland, July 8-12th
- Engqvist LG (1992) Studies on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of peas (*Pisum sativum*) in Sweden. *Norwegian Journal of Agricultural Science* 7: 111-118
- Ellzey JT, 1974. Ultrastructural observations of meiosis within antheridia of *Achlya ambisexualis*. *Mycologia* **66**, 32-47.
- Flanagan PW, 1970. Meiosis and mitosis in Saprolegniaceae. *Canadian Journal of Botany* **48**, 2069-76.
- Folkertsma RT, Rouppe vander Voort JNAM, de Groot KE, van Zandvoort PM, Schots A, Gommers FJ, Helder J, Bakker J, 1996. Gene pool similarities of Potato Cyst Nematode populations assessed by AFLP analysis. *Molecular Plant-Microbe interactions* **9**, 47-54.
- Förster H, Coffey MD, 1993. Molecular taxonomy of *Phytophthora megasperma* based on mitochondrial and nuclear DNA polymorphisms. *Mycological Research* **97**, 1101-12.
- Förster H, Kinscherf TG, Leong SA, Maxwell DP, 1989. Restriction fragment length polymorphisms of the mitochondrial DNA of *Phytophthora megasperma* isolated from soybean, alfalfa, and fruit trees. *Canadian Journal of Botany* **67**, 529-37.
- Förster H, Tyler BM, Coffey MD, 1994. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 780-91.

- Fritz VA, Allmaras RR, Pflieger FL, Davis DW, 1995. Oat residue and soil compaction influences on common root rot (*Aphanomyces euteiches*) of pea in a fine-textured soil. *Plant and soil* **171**, 235-44.
- Gerats A, Van Montagu M, Zethof J, 1997. AFLP mapping and bulked segregant analysis in *Petunia hybrida*. In: S. I. Inc. (ed.) Plant and Animal Genome V, pp. 70, San Diego, CA.
- Gibson JR, Slater E, Xerry J, Tompkins DS, Owen RJ, 1998. Use of an Amplified-Fragment Length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2580-5.
- Gonzalez M, Rodriguez R, Zavala ME, Jacobo JL, Hernandez F, Acosta J, Martinez O, Simpson J, 1998. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* **88**, 292-9.
- Goodwin DC, Lee SB, 1993. Microwave miniprep of total genomic DNA from fungi, plants, protists and animals for PCR. *BioTechniques* **15**, 438-44.
- Goodwin SB, 1997. The population genetics of *Phytophthora*. *Phytopathology* **87**, 462-73.
- Grau CR, 1976. Effect of dinitramine and trifluralin on growth, reproduction, and infectivity of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **66**, 551-6.
- Grau CR, Muehlchen AM, Tofte JE, Smith RR, 1991. Variability in virulence of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* **75**, 1153-6.
- Grau CR, Reiling TP, 1977. Effect of trifluralin and dinitramine on *Aphanomyces* root rot of pea. *Phytopathology* **67**, 273-6.
- Greenhalgh FC, Merriman PR, 1985. *Aphanomyces euteiches*, a cause of root rot of subterranean clover in Victoria. *Australasian Plant Pathology* **14**, 34-7.
- Gritton ET, 1992. Registration of five pea root rot resistant germplasm lines of processing pea. *Crop Science* **30**, 1166-7.
- Gritton ET, 1995. Offer of seed from the Earl Gritton pea Improvement program at Madison. *Pisum Genetics* **27**, 29-30.
- Hagedorn DJ, 1984. "Compendium of pea diseases". The American Phytopathological Society, St Paul, MN, USA.
- Haglund WA, King TH, 1961. Inoculation technique for determining tolerance of *Pisum sativum* to *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **51**, 800-2.
- Hansen EM, 1987. Speciation in plant pathogenic fungi : the influence of agricultural practice. *Canadian Journal of Plant Pathology* **9**, 403-10.

- Hansen EM, Brasier CM, Shaw DS, Hamm PB, 1986. The taxonomic structure of *Phytophthora megasperma*: evidence for emerging biological species groups. *Transactions of the British Mycological Society* **87**, 557-73.
- Hansen EM, Maxwell DP, 1991. Species of the *Phytophthora megasperma* complex. *Mycologia* **83**, 376-81.
- Henry J-P, Gouyon P-H, eds. , 1998. "Précis de génétique des populations," pp. 1-186. Masson, Paris.
- Heungens K, Parke JL, 2000. Zoospore homing and infection events: effects of the biocontrol bacterium *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on two Oomycete pathogens of pea (*Pisum sativum* L.). *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 5192-200.
- Holub EB, Grau CR, Parke JL, 1991. Evaluation of the *forma specialis* concept in *Aphanomyces euteiches*. *Mycological Research* **95**, 147-57.
- Hudspeth DSS, Nadler SA, Hudspeth MES, 2000. A *COX2* molecular phylogeny of the Peronosporomycetes. *Mycologia* **94**, 674-84.
- Jacobsen BJ, Hopen HJ, 1981. Influence of herbicides on *Aphanomyces* root rot of peas. *Plant Disease* **65**, 11-6.
- Jones FR, Drechsler C, 1925. Root rot of peas in the United States caused by *Aphanomyces euteiches*. *Journal of Agricultural Research* **30**, 293-325.
- Justesen AF, Hovmoller MS, 1999. Virulence and DNA-variation in wheat yellow rust. [Danish]. In: Djf Rapport.
- Keiper FJ, McConchie R, 2000. An analysis of genetic variation in natural populations of *Sticherus flabellatus* [R.Br.(St John)] using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* **9**, 571-81.
- King EB, Parke JL, 1993. Biocontrol of *Aphanomyces* root rot and *Pythium* damping-off by *Pseudomonas cepacia* AMMD on four pea cultivars. *Plant Disease* **77**, 1185-8.
- King EB, Parke JL, 1996. Population density of the biocontrol agent *Burkholderia cepacia* AMMDR1 on four pea cultivars. *Soil Biology and Biochemistry* **28**, 307-12.
- King TH, Bissonnette H, 1954. Physiological specialization in *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **44**, 495 (abs.).
- King TH, Cho YS, 1962. Oospore formation of *Aphanomyces euteiches* in root tips of *Pisum sativum* as a method of evaluating resistance. *Plant Disease Reporter* **46**, 777-9.
- King TH, Davis DW, Shehata MA and Pflieger FL (1981) Minnesota 494-A11 pea germplasm. Hort Sci 16: 100

- Kistler HC, 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* **87**, 474-9.
- Kjøller R, 1998. Detection and activity of arbuscular mycorrhizal fungi and their interaction with the pea root pathogen *Aphanomyces euteiches*. Thèse de Doctorat, University of Copenhagen, Copenhagen (Danemark).
- Kjøller R, Rosendahl S, 1998. Enzymatic activity of the mycelium compared with oospore development during infection of pea roots by *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **88**, 992-6.
- Kraft JM, 1981. Registration of 792022 and 792024 pea germplasm. *Crop Science* **21**, 352-3.
- Kraft JM, 1989a. Breeding peas for resistance to soil-borne diseases. *Pisum NewsLetter* **21**, 82-5.
- Kraft JM, 1989b. Registration of 86-638, 86-2197, 86-2231, and 86-2236 pea germplasms. *Crop Science* **29**, 494-5.
- Kraft JM, 1992. Registrations of 90-2079, 9062131 and 90-2322 pea germplasms. *Crop Science* **32**, 1076.
- Kraft JM, Boge WL, 1994. Development of an antiserum to quantify *Aphanomyces euteiches* in resistant pea lines. *Plant Disease* **78**, 179-83.
- Kraft JM, Boge WL, 1996. Identification of characteristics associated with resistance to root rot caused by *Aphanomyces euteiches* in pea. *Plant Disease* **80**, 1383-6.
- Kraft JM, Coffman VA, 2000a. Registration of 96-2052, 96-2058, 96-2068, 96-2198 and 96-2222 pea germplasms. *Crop Science* **40**, 301-2.
- Kraft JM, Coffman VA, 2000b. Registration of 97-261 and 97-2154 pea germplasms. *Crop Science* **40**, 302.
- Kraft JM, Coffman VA, 2000c. Registration of 97-363, 97-2170, and 97-2162 pea germplasm. *Crop Science* **40**, 303.
- Kraft JM, Haware MP, Jiménez-Díaz RM, Bayaa B, Harrabi M, 1994. Screening techniques and sources of resistance to root rots and wilts in cool season food legumes. *Euphytica* **73**, 27-39.
- Kraft JM, Silbernagel MJ, Muehlbauer FJ, 1972. Registration of PH114-119 and PH91 3 pea germplasms. *Crop Science* **12**, 399.
- Kraft JM, Wicker E, Rouxel F, 1998. Breeding and selection of peas for aphanomyces root rot resistance. In: AEP (ed.) "3rd European Conference on Grain Legumes - Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands", pp. 114-5, Valladolid -Spain.

- Kruskal JB, 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* **29**, 115-29.
- Labrousse F, 1933. Notes de pathologie végétale. *Revue de pathologie végétale et d'Entomologie agricole* **19**, 71-84.
- Lamari L, Bernier CC, 1985. Etiology of seedling blight and root rot of faba bean (*Vicia faba*) in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 139-45.
- Larsson M, 1994. Pathogenicity, morphology and isozyme variability among isolates of *Aphanomyces* spp. from weeds and various crop plants. *Mycological Research* **98**: 231-40.
- Leach SS, Rich AE, 1969. The possible role of parasexuality and cytoplasmic variation in race differentiation in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **59**, 1360-5.
- Lebart L, Morineau A, Lambert T, Pleuvret P, eds. , 1996. "SPAD Version 3: Manuel de référence,". CISIA, Saint-Mandé.
- Lebreton L, 1998. Structure et évolution des populations françaises de *Phytophthora infestans*, agent du mildiou de la pomme de terre et de la tomate. Thèse de Doctorat, Université de Rennes I, Rennes.
- Leclerc MC, Guillot J, Deville M, 2000. Taxonomic and phylogenetic analysis of *Saprolegniaceae* (Oomycetes) inferred from LSU rDNA and ITS sequence comparisons. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**, 369-77.
- Levy M, Correa-Victoria FJ, Zeigler RS, Xu S, Hamer JE, 1993. Genetic diversity of the rice blast fungus in a disease nursery in Colombia. *Phytopathology* **83**, 1427-33.
- Lewis ME, Gritton ET, 1988. Improving resistance to *Aphanomyces* root rot in peas via recurrent selection. *Pisum NewsLetter* **20**, 20-1.
- Lewis ME, Gritton ET, 1992. Use of one cycle of recurrent selection per year for increasing resistance to *Aphanomyces* root rot in peas. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **117**, 638-42.
- Llanos C, Lockwood JL, 1960. Factors affecting zoospore production by *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **50**, 826-30.
- Lockwood JL, 1988. Evolution of concepts associated with soilborne plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **26**, 93-121.
- Lockwood JL, Ballard JC, 1960. Evaluation of pea introductions for resistance to *Aphanomyces* and *Fusarium* root rots. *MI Quarter Bulletin* **42**, 704-13.
- Lynch M, Milligan BG, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**, 91-9.

- Majer D, Lewis BG, Mithen R, 1998. Genetic variation among field isolates of *Pyrenopeziza brassicae*. *Plant Pathology* **47**, 22-8.
- Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP, 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* **100**, 1107-11.
- Malvick DK, Percich JA, Pflieger FL, Givens J, Williams JL, 1994. Evaluation of methods for estimating inoculum potential of *Aphanomyces euteiches* in soil. *Plant Disease* **78**, 361-5.
- Malvick DK, Grau CR, Percich JA, 1998. Characterization of *Aphanomyces euteiches* strains based on pathogenicity test and random amplified polymorphic DNA analyses. *Mycological Research* **102**, 465-75.
- Malvick DK, Percich JA, 1996. Screening of pea plant introduction collection for resistance to *Aphanomyces* root rot. *Biological and Cultural Tests* **11**, 112.
- Malvick DK, Percich JA, 1998a. Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from Central and Western United States. *Phytopathology* **88**, 915-21.
- Malvick DK, Percich JA, 1998b. Variation in pathogenicity and genotype among single-zoospore strains of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* **88**, 52-7.
- Malvick DK, Percich JA, 1999. Identification of *Pisum sativum* germplasm with resistance to root rot caused by multiple strains of *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* **83**, 51-4.
- Manning MA, Menzies SA, 1980. Root rot of peas in New Zealand caused by *Aphanomyces euteiches*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **23**, 263-5.
- Manning MA, Menzies SA, 1984. Pathogenic variability in isolates of *Aphanomyces euteiches* from New Zealand soils. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **27**, 569-74.
- Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R, Baron F and Thomas G (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics* **101**: 885-891.
- Marx GA, Schroeder WT, Provvidenti R, Mishanec W, 1972. A genetic study of tolerance in pea (*Pisum sativum* L.) to *Aphanomyces* root rot. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **97**, 619-21.
- Matsumoto M, Furuya N, Matsuyama N, 1996. PCR-RFLP analysis of amplified 28S ribosomal DNA for identification of *Rhizoctonia* spp., the causal agents of sheath diseases of rice plants. *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University* **41**, 39-44.
- Maufras JY, Sanssené J, Wicker E, 1997a. Les maladies racinaires du pois (2). *Perspectives agricoles* **227**, pp. 60-7.

- Maufras JY, Wicker E, Sanssené J, 1997b. Les maladies racinaires du pois (1) - *Aphanomyces euteiches*. *Perspectives agricoles* **226**, 68-75.
- Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG, 1993. How clonal are bacteria ? *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **90**, 4384-8.
- McDonald BA, 1997. The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology* **87**, 448-53.
- Messiaen C-M, Blancard D, Rouxel F, Lafon R, 1991. Les maladies des plantes maraîchères. Paris: INRA Editions.
- Milgroom MG, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 457-77.
- Moricca S, Ragazzi A, 1998. Use of RFLP and SSCP analysis to differentiate the pine rusts *Cronartium flaccidum* and *Peridermium pini*. *Mycological Research* **102**, 666-70.
- Morin V , 2000. Caractérisation biologique et moléculaire d'isolats d'*Aphanomyces euteiches*, à l'échelle parcellaire. Rapport de DUFAST (Diplôme Universitaire de Formation Appliquée aux Sciences et Techniques), Université de Pau et des Pays de l'Adour ; 39 pages.
- Morrison RH, Johnson JK, King TH, Davis DW, 1971. An evaluation of the excised root tip method for determining the reaction of *Pisum sativum* to *Aphanomyces euteiches*. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **96**, 616-9.
- Moussart A, Wicker E, Duparque M, Rouxel F, 2001. Development of an efficient screening test for pea resistance to *Aphanomyces euteiches*. In: AEP (ed.) "4th European Conference on Grain Legumes - Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products", pp.272-3, Cracow, Poland.
- Muehlchen AM, Rand RE, Parke JL, 1990. Evaluation of crucifer green manures for controlling *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant Disease* **74**, 651-4.
- Mueller UG, Wolfenbarger LL, 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* **14**, 389-94.
- Mugnier J, 1998. Molecular evolution and phylogenetic implications of ITS sequences in plants and in fungi. In "Molecular variability of fungal pathogens" (P. D. Bridge, Y. Couteaudier and J. M. Clarkson, eds.), pp.253-77. CAB International, Wallingford, UK.
- Munkvold GP, Cralton WM, Brummer EC, Meyer JR, Undersander DJ, Grau CR, 2001. Virulence of *Aphanomyces euteiches* isolates from Iowa and Wisconsin and benefits of resistance to *A.euteiches* in alfalfa cultivars. *Plant Disease* **85**, 328-33.
- Nei M, 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-90.

- Nelson RR, 1978. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* **16**, 359-78.
- Neu C, Kaemmer D, Kahl G, Fischer D, Weising K, 1999. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* **8**, 523-5.
- Ochoa J, Frinking HD and Jacobs T (1998) Postulation of virulence groups and resistance factors in the quinoa/downy mildew pathosystem using material from Ecuador. *Plant Pathology* **48**, 425-30.
- O'Neill NR, Berkum Pv, Lin J, Kuo J, Ude GN, Kenworthy W, Saunders JA, 1997. Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopathology* **87**, 745-50.
- Orlando D, Mahaut B, Barrier-Guillot B, Carrouée B, 1999. Pois- Une récolte 1999 de qualité. *Perspectives agricoles* **252**, 16-8.
- Othieno Abbo E, Irwin JAG, 1990. *Aphanomyces euteiches*, a possible cause of poor lucerne establishment in the Lockyer Valley, Queensland. *Australian Journal of Experiment Agriculture* **30**, 361-4.
- Owen PG, Ming P, Karp A, Royle DJ, Edwards KJ, 1998. Isolation and characterization of microsatellite loci in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Ecology* **7**, 1611-2.
- Oyarzun PJ, Dijst G, Zoon FC, Maas PWT, 1997. Comparison of soil receptivity to *Thielaviopsis basicola*, *Aphanomyces euteiches*, and *Fusarium solani* f.sp. *pisi* causing root rot in pea. *Phytopathology* **87**, 534-41.
- Oyarzun PJ, Gerlagh M, Hoogland AE, 1993. Pathogenic fungi involved in root rot of peas in the Netherlands and their physiological specialization. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **99**, 23-33.
- Oyarzun PJ, van Loon J, 1989. *Aphanomyces euteiches* as a component of the complex of foot and root pathogens of peas in Dutch soils. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **95**, 259-64.
- Palacios C, Kresovich S, Gonzalez-Candelas F, 1999. A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (*Plumbaginaceae*) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* **8**, 645-57.
- Papavizas GC, Ayers WA, eds. , 1974. "Aphanomyces species and their root diseases on pea and sugarbeet," U.S. Department of Agricultural Research Technical Bulletin 1485, pp. 1-157.
- Parke JL, 1990. Population dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. *Phytopathology* **80**, 1307-11.

- Parke JL, Rand RE, Joy AE, King EB, 1991. Biological control of Pythium damping-off and Aphanomyces root rot of pea by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Disease* **75**, 987-92.
- Parke JL, Grau CR, 1992. *Aphanomyces*. In "Methods on research on soilborne phytopathogenic fungi" (L. L. Singleton, J. D. Mihail and C. M. Rush, eds.). pp.27-30. APS Press, St Paul, Minnesota.
- Pascual CB, Toda T, Raymondo AD, Hyakumachi M, 2000. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize. *Plant Pathology* **49**, 108-18.
- Pei MH, Ruiz C, 2000. AFLP evidence of the distinctive patterns of life-cycle in two forms of *Melampsora* rust on *Salix viminalis*. *Mycological Research* **104**, 937-42.
- Pei MH, Yuan ZW, Hunter T, Ruiz C, 2000. Heterogeneous nature of a 'new' pathotype of *Melampsora* rust on *Salix* revealed by AFLP. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 771-9.
- Persson L, Bødker L, Larsson-Wilkström M, 1997. Prevalence and pathogenicity of foot and root rots of pea in Southern Scandinavia. *Plant Disease* **81**, 171-4.
- Persson L, Larsson-Wilkström M, Gerhardson B, 1999. Assessment of soil suppressiveness to *Aphanomyces* root rot of pea. *Plant Disease* **83**, 1108-12.
- Persson L, Olsson S, 2000. Abiotic characteristics of soils suppressive to *Aphanomyces* root rot. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1141-50.
- Pfender WF, Hagedorn DJ, 1982. *Aphanomyces euteiches* f. sp. *phaseoli*, a causal agent of bean root and hypocotyl rot. *Phytopathology* **72**, 306-10.
- Pfender WF, Hagedorn DJ, 1983. Disease progress and yield loss in *Aphanomyces* root rot of peas. *Phytopathology* **73**, 1109-13.
- Pietro AD, Garcia-Maceira FI, Huertas-Gonzalez MD, Ruiz-Roldan MC, Caracuel Z, Barbieri AS, Roncero MIG, 1998. Endopolygalacturonase PG1 in different formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1967-71.
- Pilet ML, 1999. Analyse génétique de la résistance du colza à la nécrose du collet et à la cylindrosporiose à l'aide de marqueurs moléculaires. Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Pilet-Nayel M-L, Kraft JM, McGee RJ, Muehlbauer FJ, Baranger A, Coyne CJ, 2001. Quantitative Trait Loci mapping for *Aphanomyces* root rot resistance in pea. In: AEP (ed.) "4th

- European Conference on Grain Legumes - Towards the sustainable production of healthy food, feed and novel products", pp. 12-13, Cracow, Poland.
- Pongam P, Osborn TC, Williams PH, 1999. Assessment of genetic variation among *Leptosphaeria maculans* isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease* **83**, 149-54.
- Pueppke SG, VanEtten HD, 1974. Pisatin accumulation and lesion development in peas infected with *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium solani* f.sp.*pisi*, or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **64**, 1433-40.
- Pueppke SG, VanEtten HD, 1976. The relation between pisatin and the development of *Aphanomyces euteiches* in diseased *Pisum sativum*. *Phytopathology* **66**, 1174-85.
- Purwantara A, Flett SP and Keane PJ, 1995. Variation in pathogenicity and virulence of *Phytophthora clandestina* on four cultivars of subterranean clover. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **35**, 717-724.
- Purwantara A, Flett SP, Keane PJ, 1998. Colonization of roots of subterranean clover cultivars by virulent and avirulent races of *Phytophthora clandestina*. *Plant Pathology* **47**, 67-72.
- Purwantara A, Barrins JM, Cozijnsen AJ, Ades PK, Howle BJ, 2000. Genetic diversity of isolates of the *Leptosphaeria maculans* species complex from Australia, Europe and North America using amplified fragment length polymorphism analysis. *Mycological Research* **104**, 772-81.
- Qi X, Jiang G, Chen W, Niks RE, Stam P, Lindhout P, 1999. Isolate-specific QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* in barley. *Theoretical and Applied Genetics* **99**, 877-84.
- Qin L, Overmars H, Helder J, Popeijus H, van der Voort JR, Groenink W, van Koert P, Schots A, Bakker J, Smant G, 2000. An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 830-6.
- Rademaker JLW, Hoste B, Louws FJ, Kersters K, Swings J, Vauterin L, Vauterin P, de Bruijn FJ, 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies : *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 665-77.
- Rao A , 1994. Reactions of pea genotypes to *Aphanomyces euteiches*. **Master of Science Thesis, University of Wisconsin-Madison**, Madison, Wisconsin.
- Rao A, Gritton ET, Peterson LA, 1995. Aeroponics chambers for evaluating resistance to *Aphanomyces* root rot of peas (*Pisum sativum*). *Plant Disease* **79**, 128-32.
- Rapilly F, 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale. Paris: INRA editions.

- Riethmuller A, Weiss M, Oberwinkler F, 1999. Phylogenetic studies of Saprolegniomycetidae and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany* **77**, 1790-800.
- Rosendahl S, 1985. Interactions between the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathologische Zeitschrift* **114**, 31-40.
- Rosendahl S, Taylor JW, 1997. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLPtm. *Molecular Ecology* **6**, 821-9.
- Rosewich UL, Pettway RE, McDonald BA, Kistler HC, 1999. High levels of gene flow and heterozygote excess characterize *Rhizoctonia solani* AG1-IA (*Thanatephorus cucumeris*) from Texas. *Fungal Genetics and Biology* **28**, 148-59.
- Russell JR, Weber JC, Booth A, Powell W, Sotelo-Montes C, Dawson IK, 1999. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology* **8**, 199-204.
- Rutherford FS, Ward EWB, Buzzell RI, 1985. Variation in virulence in successive single-zoospore propagations of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Phytopathology* **75**, 371-4.
- Salt GA, 1988. Root diseases of *Vicia faba* L. In "The Faba bean (*Vicia faba* L.)" (P. D. Hebblethwaite, ed.), pp.393-419. Butterworths, London, Boston, Durban.
- Salt GA, Delaney KD, 1986. Effect of previous legume crops on pea and bean root diseases. In "The pea crop" (P. D. Hebblethwaite, M. C. Heath and T. C. K. Dawkins, eds.), pp. 247-56. Butterworths, London, Boston, Durban.
- SAS, 1996. SAS/STAT User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Schmitthenner AF, 2000. Phytophthora rot of soybean. *Plant Health Progress- Plant Health Management (electronic on line-journal)*.
- Schnieder F, Koch G, Jung C, Verreet JA, 1998. The application of molecular markers for genetic characterization of *Septoria tritici* populations. *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105**, 452-61.
- Scott WW, 1961. A monograph of the genus *Aphanomyces*. Blacksburg, Virginia: Virginia Agricultural Experiment Station Technical Bulletin 151; 94 pp.
- Semlat JP, Wajnberg E, Dalmaso P, Abad P, Castagnone-Sereno P, 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* **7**, 119-25.

- Semblat JP , 1999. Etude du polymorphisme inter et intraspécifique chez les nématodes parthénogénétiques du genre *Meloidogyne*. Application à l'analyse comparative de lignées quasi-isogéniques avirulentes et virulentes de *Meloidogyne incognita*. Thèse de Doctorat, Lille II.
- Semblat JP, Bongiovanni M, Wajnberg E, Dalamasso A, Abad P, Castagnone-Sereno P, 2000. Virulence and molecular diversity of parthenogenetic root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp. *Heredity* **84**, 81-9.
- Shang H, Grau CR, Peters RD, 2000a. Evidence of gene flow between pea and bean pathotypes of *Aphanomyces euteiches*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **22**, 265-75.
- Shang H, Grau CR, Peters RD, 2000b. Oospore germination of *Aphanomyces euteiches* in root exudates and on the rhizoplanes of crop plants. *Plant Disease* **84**, 994-8.
- Shang H, Grau CR, Peters RD, 2000c. Variation in virulence, host specificity, hyphal growth rate, and size of the aplerotic zone in successive single-zoospore and single-oospore progenies of *Aphanomyces euteiches*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **22**, 160-5.
- Shehata MA, Davis DW, Bissonnette HL, 1976. A new testing approach for breeding peas resistant to common root rot caused by *Aphanomyces euteiches* Drechs. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **101**, 257-61.
- Shehata MA, Davis DW, Pflieger FL, 1983a. Breeding for resistance to *Aphanomyces euteiches* root rot and *Rhizoctonia solani* stem rot in peas. *Journal of the American Society of Horticultural Science* **108**, 1080-5.
- Shehata MA, Pflieger FL, Davis DW, 1983b. Response of susceptible and moderately resistant pea genotypes to interaction between *Rhizoctonia solani* and three other stem and root rot pathogens. *Plant Disease* **67**, 1146-8.
- Slezack S , 1999. Etude de la bioprotection du pois (*Pisum sativum* L.) par le champignon mycorrhizogène à arbuscules *Glomus mossae* vis-à-vis du champignon pathogène *Aphanomyces euteiches*. Thèse de Doctorat, Université de Bourgogne, Dijon.
- Smolinska U, Knudsen GR, Morra MJ, Borek V, 1997a. Inhibition of *Aphanomyces euteiches* f.sp. *pisi* by volatiles produced by hydrolysis of *Brassica napus* seed meal. *Plant Disease* **81**, 288-92.
- Smolinska U, Morra MJ, Knudsen GR, Brown PD, 1997b. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassica napus* seed meal towards *Aphanomyces euteiches* f.sp. *pisi*. *Phytopathology* **87**, 77-82.
- Sneath PHA, Sokal RR, 1973. Numerical taxonomy: W.H. Freeman and Co., San Francisco.

- Some A, Manzanares M, Laurens F, Baron F, Thomas G and Rouxel F, 1996. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* 45: 432-39.
- Sundheim L, 1972. Physiological specialization in *Aphanomyces euteiches*. *Physiological Plant Pathology* 2, 301-6.
- Sweigard J, VanEtten HD, 1987. Reduction in pisatin sensitivity of *Aphanomyces euteiches* by polar lipid extracts. *Phytopathology* 77, 771-5.
- Tenzer I, Ivanissevich SD, Morgante M, Gessler C, 1999. Identification of microsatellite markers and their application to population genetics of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 89, 748-53.
- Tivoli B, Roger C, Onfroy C, Lemarchand E, 1996. Epidémiologie de l'antracnose et perspectives de lutte. In: UNIP (ed.) Forum pois, pp. 18-20, Paris.
- Tofte JE, Smith RR, Grau CR, 1992. Reaction of red clover to *Aphanomyces euteiches*. *Plant Disease* 76, 39-42.
- Travis SE, Maschinski J, Keim P, 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology* 5, 735-45.
- Tu JC, 1987. Integrated control of the pea root rot disease complex in Ontario. *Plant Disease* 71, 9-13.
- Tyler BM, Förster H, Coffey MD, 1995. Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 515-23.
- Udupa SM, Weigand F, Saxena MC, Kahl G, 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. *Theoretical & Applied Genetics* 97, 299-307.
- Vandemark GJ, Kraft JM, Larsen RC, Gritsenko MA, Boge WL, 2000. A PCR-based assay by sequence-characterized DNA markers for the identification and detection of *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology* 90, 1137-44.
- Vandemark G, Martinez O, Pecina V, Jesus Alvarado Md, 2000. Assessment of genetic relationships among isolates of *Macrophomina phaseolina* using a simplified AFLP technique and two different methods of analysis. *Mycologia* 92, 656-64.
- VanEtten HD, 1973. Differential sensitivity of fungi to pisatin and to phaseollin. *Phytopathology* 63, 1477-82.

- Van der Lee T, de Witte I, Drenth A, Alfonso C, Govers F, 1997. AFLP linkage map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal genetics and biology* **21**, 278-91.
- Vilgalys R, Gonzalez D, 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism in *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **80**, 151-8.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-14.
- Walpole RE, Myers RH, eds. , 1978. "Probability and statistics for engineers and scientists," pp. 1-580. MacMillan Publishing, New-York.
- Wang X-R, Szmidt AE, 2000. Population genetic analysis of pathogenic forest fungi. In "Molecular biology of woody plants" (S. J. a. S. Minocha, ed.), Vol. 1. Kluwer Academic Publisher.
- Weeden NF, McGee R, Grau CR, Muehlbauer FJ, 2000. A gene influencing tolerance to common root rot is located on linkage group IV. *Pisum Genetics* **32**, 53-5.
- Weir BS, 1996. Genetic data analysis II: Sinauer, Sunderland.
- Whisson SC, Drenth A, McLean DJ, Irwin JAG, 1994. Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker to two avirulence genes. *Current Genetics* **27**, 77-82.
- Wicker E, Rouxel F, 1998. *Aphanomyces euteiches* on pea in France : receptivity of some soils related to their physical properties. In: AEP (ed.) "3rd European Conference on Grain Legumes- Opportunities for high quality, healthy and added-value crops to meet European demands", pp. 256-7. Valladolid - Spain.
- Williams-Woodward JL, Pfleger FL, Fritz VA, Allmaras RR, 1997. Green manures of oat, rape and sweet corn for reducing common root rot in pea (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Plant and soil* **188**, 43-8.
- Woo SL, Noviello C, Lorito M, 1998. Sources of molecular variability and applications in characterization of the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. pp. 187-209 In "Molecular variability of fungal pathogens" (P. Bridge, Y. Couteaudier and J. Clarkson, eds.). CAB International, Wallingford.
- Yan G, Romero-Severson J, Walton M, Chadee DD, Severson DW, 1999. Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* **8**, 951-63.

-
- Yokosawa R, Kuninaga S, Teranaka M, 1974. [Note on pea root rot fungus, *Aphanomyces euteiches* Drechs. in Japan]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **40**, 454-7.
(en Japonais)
- Young ND, 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 479-501.
- Zhang AW, Hartman GL, Curio-Penny B, Pedersen WL, Becker KB, 1999. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology* **89**, 796-804.

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1 : Variabilité du pouvoir pathogène sur Légumineuses d'isolats monozospores d'*A.euteiches*.

Annexe 2 : Spécificité d'hôte d'isolats d'une même exploitation et/ou d'une même parcelle.

Annexe 3 : Analyse SSCP des amplifiats de la région 28S de l'ADNr d'isolats d'*Aphanomyces euteiches* et *Saprolegnia* sp.

Annexe 4 : Préparation de cultures d' *A.euteiches* pour extraction d'ADN.

Annexe 5 : Protocoles d'extraction d'ADN testés sur *A.euteiches*.

Annexe 6 : Electrophorégramme obtenu sur Genescan[®] (ABI310, PE-Applied Biosystems).

Annexe 7 : Traitement des données ABI310 sur Bionumerics.

Annexe 8 : Gel "virtuel" reconstitué par Bionumerics d'après les données ABI310.

Annexe 9 : Matrice des marqueurs AFLP amplifiées par la combinaison d'amorces E+AAT/M+CTG.

Annexe 10 : Matrice des marqueurs AFLP amplifiées par la combinaison d'amorces E+ACC/M+CGT.

Annexe 11 : Indices de Shannon H'_j des loci présents dans les 4 phénotypes de virulence.

Annexe 12 : Indices de Shannon H'_j des loci présents dans les pathotypes.

Annexe 13 : Indices de Shannon H'_j des loci présents dans les différentes populations de parcelles, bassins, collection nationale et internationale.

Annexe 1 Variabilité du pouvoir pathogène sur Légumineuses d'isolats monozoosporés d'*A. euteiches*

Cette étude avait pour but d'évaluer la variabilité pathogène pouvant exister à l'intérieur d'un isolat-population.

Dans ces essais, les descendances de deux isolats du champ ont été comparées à leurs souches-mères respectives :

- Ae84, isolé sur pois d'une parcelle des Pyrénées Atlantiques, est polyphage (voir Table 1.1). La question était donc de voir si les souches-monosporées filles seraient aussi polyphages, ou si on observerait une ségrégation de virulence (certaines plus spécialisées sur pois, d'autres spécialisées sur haricot, ..)
- Ae 112, isolé de haricot dans le Wisconsin, est agressif sur haricot et non-pathogène sur pois. La question était ici de savoir si certaines souches-monosporées filles seraient pathogènes sur pois.

Matériel et méthodes

Les isolats monozoosporés ont été isolés selon une technique dérivée de Holub *et al.* (1991) (Abjean-Uguen, 1999). De chaque isolat du champ ont été tirés 40 à 50 monospores, dont 30 étaient sélectionnées pour les tests de pouvoir pathogène.

Leur spécificité d'hôte a été étudiée par la méthodologie exposée dans le Chapitre 1, Partie I.

Résultats et discussion

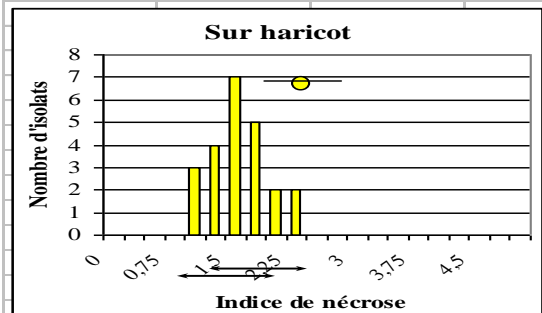
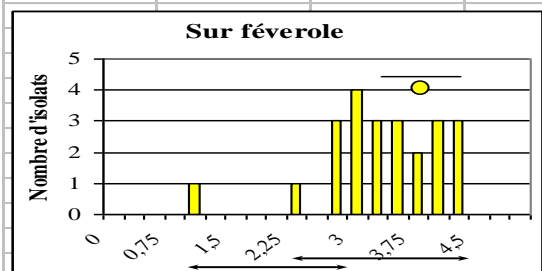
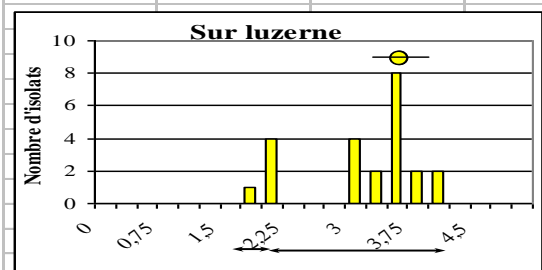
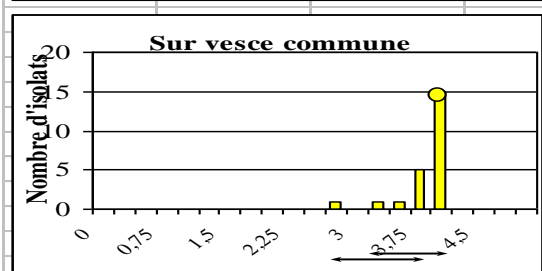
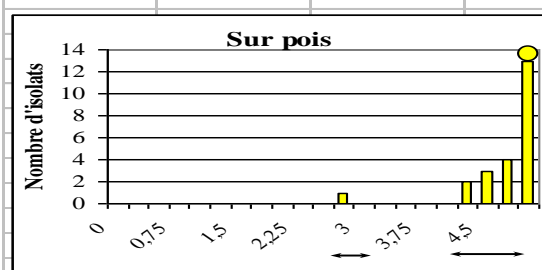
Les isolements de monospores ont été assez fastidieux, particulièrement pour le cas de l'isolat Ae84 (de nombreuses spores, après avoir formé un tube germinatif relativement long, ont stoppé toute croissance). Nous avons finalement récupéré 23 isolats fructifères (i.e. producteurs de zoospores) de Ae84 et 30 isolats fructifères de Ae112.

Les isolats monozoosporés ont le même profil de spécificité d'hôte que leur souche parentale, et ne sont pas significativement plus agressives que leur souche parentale, à l'exception de Ae112(38) sur féverole. Certains isolats ont plutôt tendance à être moins agressifs (voir le cas des souches-filles de Ae84 sur luzerne).

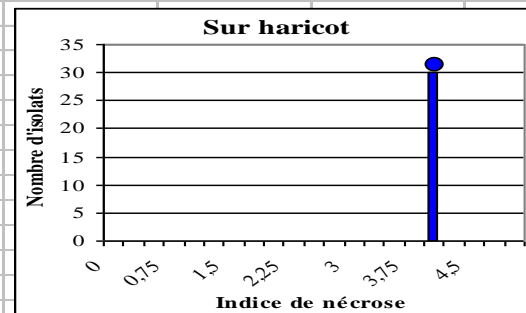
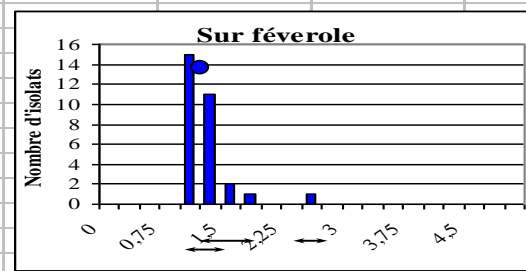
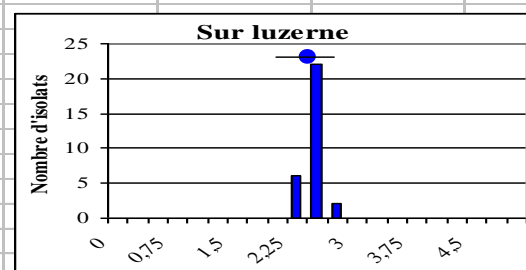
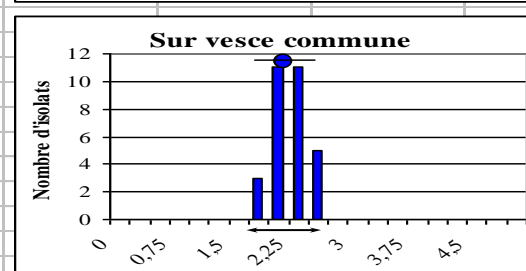
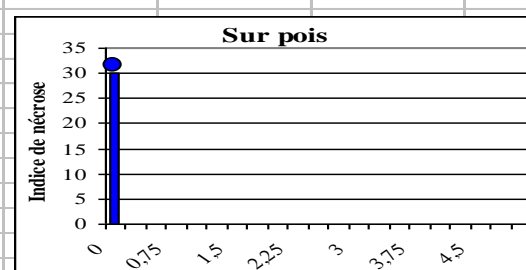
Aucune ségrégation de virulence n'est donc observée dans les descendances monosporées.

Par ailleurs, les souches monosporées présentent souvent une croissance mycélienne moins rapide et une sporulation moins importante.

Ae84 (23 isolats monospores)



Ae112 (30 isolats monospores)



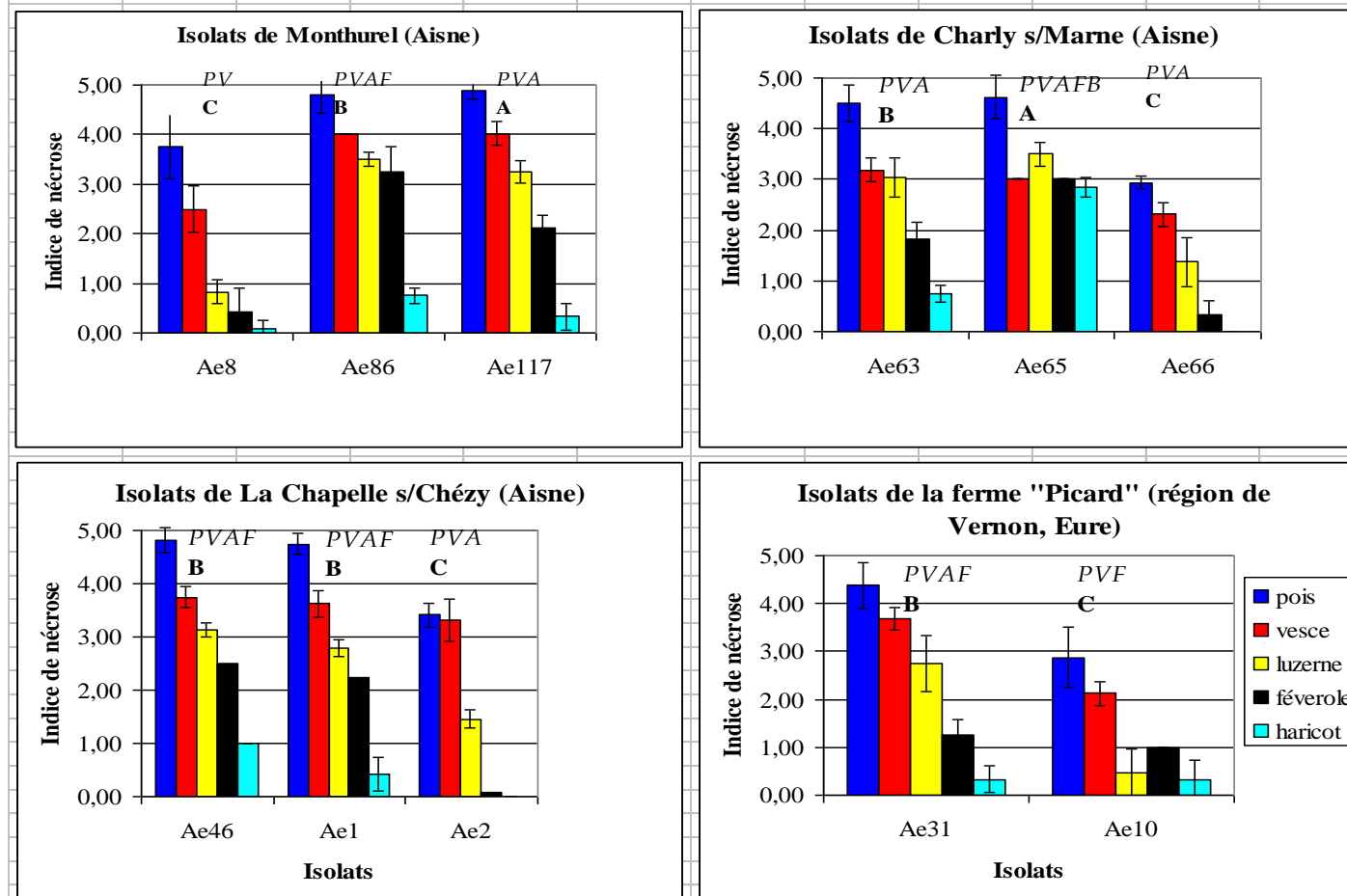
Répartition des isolats monospores issus de Ae84 et Ae112 selon leur indice de nécrose sur une gamme de 5

Légumineuses

La moyenne et l'écart-type d' indice de nécrose de l'isolat parental sont représentés par un cercle plein et une barre, au dessus de chaque histogramme.

Les groupes de Newmann-Keuls sont représentés par des flèches horizontales sous l'axe des abscisses.

Annexe 2 Spécificité d'hôte d'isolats d' *A. euteiches* d'une même exploitation, e

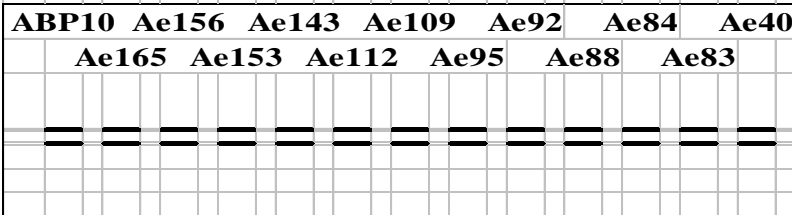


Les phénotypes de virulence et pathotypes auxquels appartiennent les isolats sont notés au-dessus des diagrammes.

A black and white photograph of a film strip. The strip is oriented horizontally and shows several frames. The frames contain dark, indistinct shapes, possibly reflections or objects, but no legible text or clear figures are visible. The film strip is slightly curved and has some visible sprocket holes or markings along its edges.



A black and white photograph of a document page. The page contains a grid of dark, rectangular marks, possibly a form or a table. The marks are arranged in rows and columns, with some marks appearing as solid black rectangles and others as lighter, possibly faded or partially filled, rectangles. The overall appearance is that of a scanned document with a grid-like structure.



En revanche , aucune différence n'est observée entre isolats d'*A.euteiches* , qu'ils soient danois (ABP10), Canadiens (Ae165), australiens (Ae156, Ae153), Japonais (Ae143), américains (Ae109, Ae112), ou français (Ae40, Ae83, Ae84, Ae88, Ae92, Ae95).

1 BESOINS

- Milieu MBR : 2 boîtes de Petri 55/isolat (~ 10 ml)
- Milieu Peptone-Glucose+rifampicine (PG+R) : 2 boîtes de Petri 90/isolat (~ 40 ml)
- Papiers filtre Wathman GF-1
- Tubes Eppendorf 2 ml, stériles (autoclavés)
- Azote liquide
- Eau stérile

2 CHRONOLOGIE

J0 : Sortir les tubes de l'étuve à 10°C – Les laisser au moins 3 heures à 25°C.

J1 : Repiquer chaque isolat sur 2 boîtes de MBR

Laisser en croissance à 22°C, 3-4 jours

J5 : Transférer 10 pastilles gélosées (Ø 5 mm) par boîte de milieu, 2 boîtes par isolat, sous hotte ou en salle stérile

NB : Ne pas trop remuer et incliner les boîtes – Mettre éventuellement du Parafilm.

Incuber à 22°C, durant 6 jours au plus.

J11 : Filtration des cultures sous vide, en conditions stériles (salle stérile, ou sous hotte)

Important : Stériliser la veille

- un appareil à filtration
- de l'eau permutée : ~ 60 ml / isolat

Vérifier que l'on dispose d'assez de filtres Whatman GF-1.

- Vider une bonne partie du milieu liquide dans un erlen-poubelle
- Enlever les pastilles gélosées, à la pince préalablement flambée
- Transférer les paquets de mycélium dans le bol à filtration – Brancher le vide
- Couper le vide, verser environ 20 ml d'eau (premier rinçage), puis refiltrer sous vide
- Renouveler cette opération 2 fois
- Transférer la culture en Eppendorf stérile

- Changer de filtre, et stériliser le bol avec de l'Ethanol 95°.

Congélation à –80°C pendant au moins une demi-journée

J12 : Lyophilisation des cultures congelées

Laisser lyophiliser 3 jours

Après lyophilisation, refermer rapidement les tubes et les retransférer à –80°C ou –20°C.

J15 : Broyage des lyophilisats dans l'azote liquide

- Poser les tubes de lyophilisat dans la glace
- Ouvrir les tubes, verser de l'azote liquide (attention aux éventuelles projections de mycélium)
- Broyer les tissus à l'aide d'un pilon et d'une fraise "Pellet pestle", jusqu' à obtenir une fine poudre.

Si la poudre remplit plus de la moitié de la partie conique de l'Eppendorf, la répartir en plusieurs tubes

J15-16 : Extraction d'ADN

3 MILIEUX DE CULTURE

• *Milieu liquide : PG+Rifampicine (40 ppm)*

Peptone : 20 g

Glucose : 5 g

Eau permutée : 1 l.

Autoclaver : 115°C/25 min.

Peser 40 mg de Rifampicine (gants indispensables)

Dissoudre dans 2 ml d'Ethanol 95°

Verser dans le milieu PG, homogénéiser

• *MILIEU MBR =CMA+Métalaxyl (30 ppm)-Bénomyl (5 ppm)-Rifampicine (25 ppm)*

Sigma Corn Meal Agar : 10 g

Agar : 10 g

Fongicides (x100) : 10 mL

Rifampicine (x100) : 10 mL
Eau permutée stérile : qsp 1L

1. Solution-mère de fongicides (x100) :

Métalaxyl : 300 mg , soit 857 mg d' APRON[®] ou 1,2 g de A5505B
Bénomyl : 50 mg , soit 100 mg de BENLATE[®]
Eau stérile : 100 ml

A stocker en fiole stérile, à 4°C.

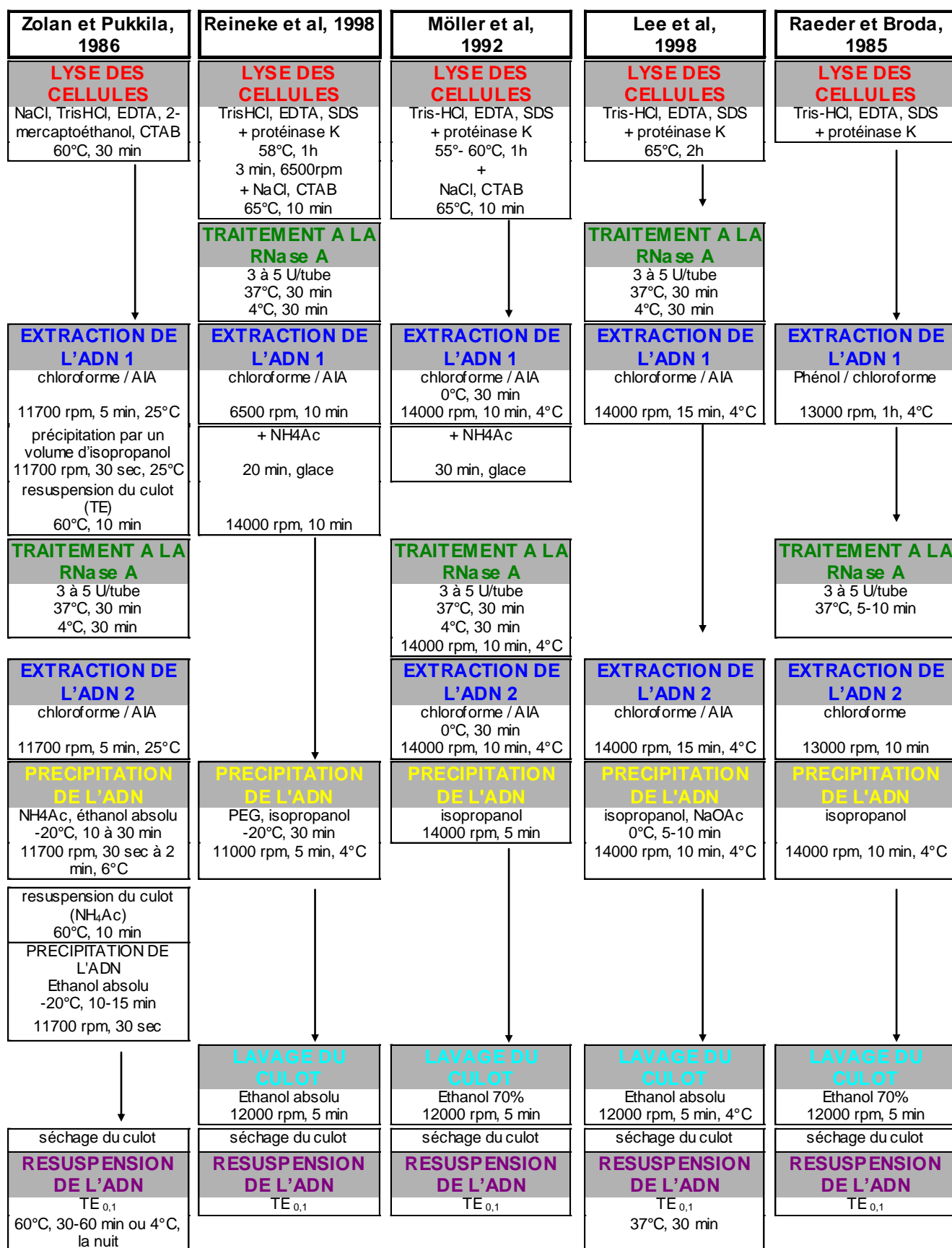
2. Solution-mère de Rifampicine (x100)

Rifampicine : 25 mg
Eau stérile : 10 mL

Remarque : il est préférable de dissoudre la rifampicine dans l' alcool : 25 mg de Rifampicine dans 2 ml d' alcool, pour dissoudre ; mettre sous l' eau chaude pour finir de faire fondre. Puis ajouter les 8 ml d'eau restants.

A stocker à 4°C, à l' abri de la lumière.

Annexe 5 : Protocoles d'extraction d'ADN testés sur *A.euteiches*



- Rendement très faible à nul

- ADN contaminé par protéines et ARN

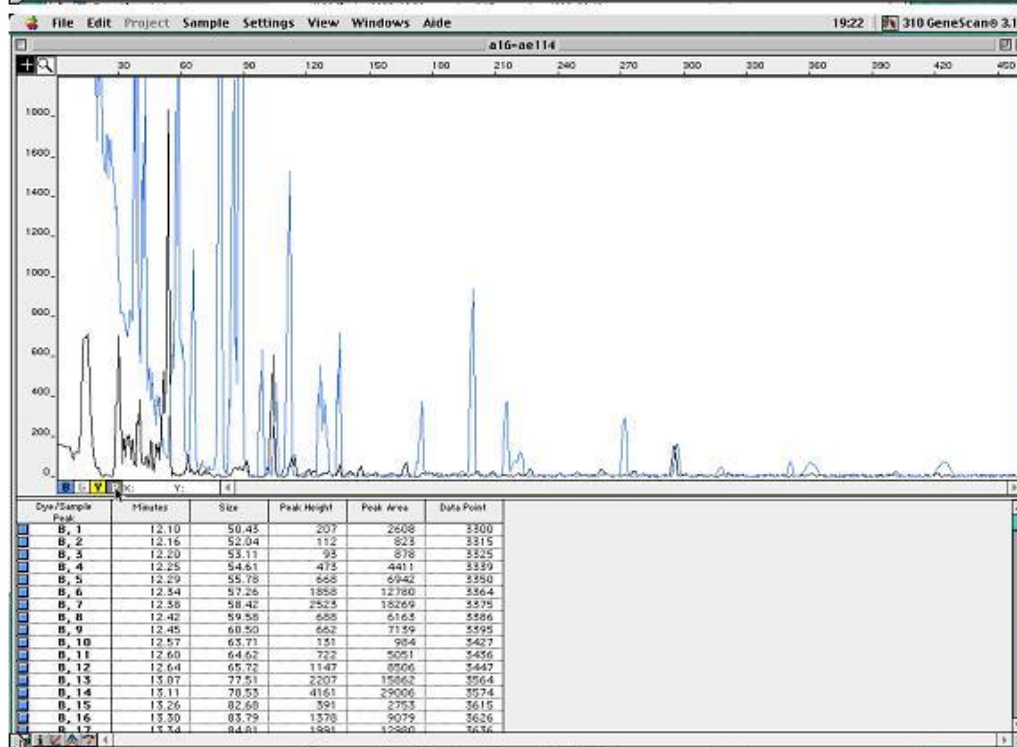
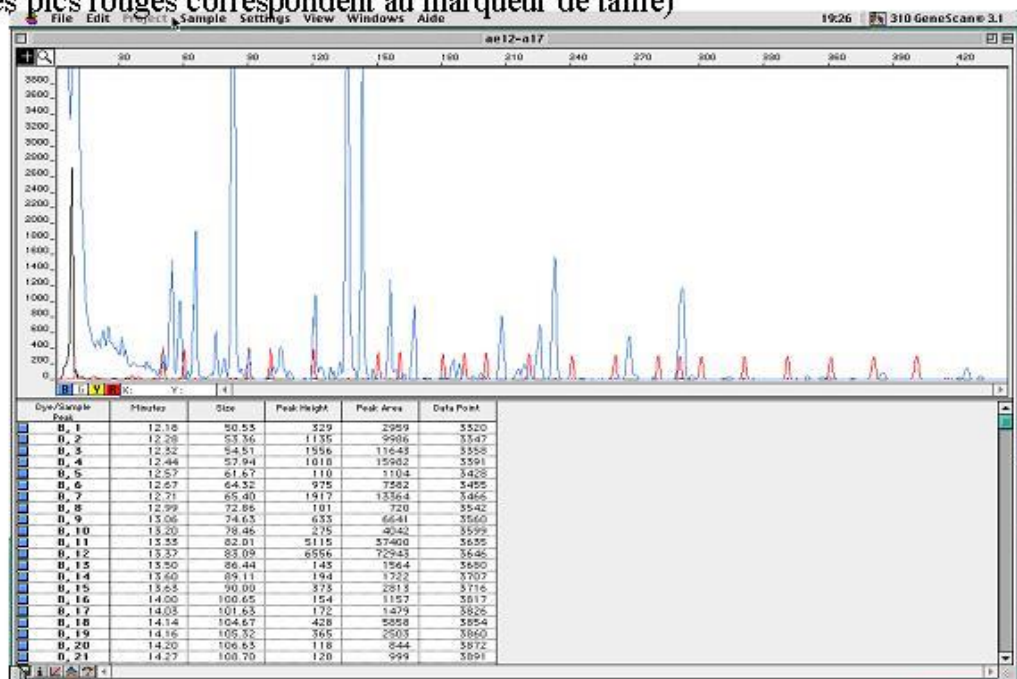
- ADN dégradé

- ADN contaminé par ARN

- Rendement nul

Annexe 6 Electrophorégrammes AFLP sur Genescan

(les pics rouges correspondent au marqueur de taille)



Annexe 7 Analyse des données AFLP obtenues sur ABIPrism 310, par le logiciel **BioNumerics** 1.50 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique)

Ce logiciel, très convivial, permet de visualiser les différents échantillons sur un gel virtuel, d'en déduire des matrices binaires et des calculs de distance génétique.

Les fichiers-échantillons sont tout d'abord transférés, grâce au logiciel DAVE, de l'ABIPrism vers l'environnement PC.

1 IMPORTATION DES FICHIERS-ÉCHANTILLONS PAR "ABICONV"

Après avoir créé une base de données Bionumerics correspondant aux différents isolats testés, on importe ensuite les fichiers-échantillons intéressants, par l'interface "ABIconv".

Un fichier-échantillon produit par GENESCAN comporte 4 courbes densitométriques, correspondant aux 4 fluorescences possibles : vert, bleu, jaune et rouge. Lorsqu'on importe un fichier GENESCAN (appelé par exemple aeX), ABIconv le dissocie systématiquement en 4 fichiers, contenant chacun une des quatre couleurs : aeX_01.crv contient le tracé vert, aeX_02.crv le bleu, aeX_03.crv le jaune (ou noir), aeX_04.crv le rouge, et ceci même si l'échantillon ne contient qu'un type de fluorescence.

Nos fichiers échantillons comportaient le plus souvent un tracé bleu (amplifiats Eco+AAT/Mse+CTG), un tracé noir (amplifiats Eco+ACC/Mse+CGT) et un tracé rouge (marqueur de taille 400HD). Pour la suite du traitement, seuls les fichiers *_02, *_03 et surtout *_04 étaient considérés (les autres fichiers étaient vides).

Il est possible, et très pratique, d'exporter plusieurs fichiers dans une même fenêtre. Il est par contre indispensable de noter l'ordre des échantillons, afin de pouvoir par la suite relier chaque tracé à un nom d'isolat.

Pour pouvoir analyser nos données sous Bionumerics, 5 opérations sont indispensables :

- créer des "fingerprint types" (par exemple AFLPaat-ctg), pour lesquels on spécifie que les données d'entrée sont des courbes densitométriques

- normaliser le fichier contenant les pics de chaque marqueur de taille (aeX_04), et le lier au(x) fichier(s) de données correspondant(s) : aeX_02 ou aeX_03
- analyser les données AFLP
- associer chaque piste du fichier de données à un isolat
 - choisir des paramètres de comparaison des différentes bandes

2 NORMALISATION DU FICHIER "MARQUEUR DE TAILLE", AEX_04 (ROUGE)

Bionumerics importe l'intégralité du tracé brut de migration, (généralement long de 6752 points) : le début de run qui ne contient aucun signal, le pic de fluorescence correspondant au passage des plus petits fragments (amorces), puis les pics qui nous intéressent.

Théoriquement, des fragments de même taille doivent migrer à la même vitesse dans les conditions du séquenceur, et donc être détectés au même moment. En réalité, on s'aperçoit que beaucoup d'échantillons n'ont pas exactement la même durée, et que des tracés correspondant à des fragments de même taille peuvent ne pas être alignés.

Pour recaler les échantillons les uns par rapport aux autres et les comparer, il faut donc tout d'abord recaler les marqueurs de taille les uns par rapport aux autres. Cette opération est appelée **normalisation du fichier "marqueur de taille"**.

Cette étape est primordiale pour la pertinence des analyses qui vont suivre.

Procédure

- Dans "file/new experiment file data", sélectionner aeX_04.
- Dans la fenêtre "1.Stripes", activer la fonction "Autosearch lanes", qui définit automatiquement les différentes pistes (= échantillons) du gel virtuel. Pour mieux contraster les bandes, on applique dans "Settings/Filter" le filtre médian (dans le menu "Edit/Change brightness and contrast").
- Dans la fenêtre "2.Curves", et le menu "Edit tone curve", on choisit "linear", sans renforcer les bandes mineures.
- Après avoir défini les tailles de bandes du marqueur de taille (se référer pour cela aux rubriques "reference", "standard" dans le manuel d'utilisation), on peut passer à la normalisation du gel virtuel (fenêtre "3. Normalization").

On coche "references/use all lanes as reference lanes" : le logiciel recherche les bandes (commande "autoassign bands") et les assigne automatiquement aux différentes tailles de fragments du marqueur. (paramètres dans "4.Bands" : minimal profiling = 5 ; minimal area = 0.0% ; shoulder sensitivity = 4). Il est indispensable de vérifier l'assignation des bandes aux tailles correspondantes, voire assigner les bandes soi-même (par la commande "assign reference position").

Une fois que toutes les bandes sont correctement assignées sur le marqueur, le fichier aeX_04 est sauvé et fermé.

Puis on retourne dans la fenêtre "Base" et l'on associe le fichier aeX_04, appelé maintenant "reference gel" au fichier de données correspondant, par exemple aeX_02. Chacune des pistes de aeX_02 sera ainsi calée sur la piste correspondante dans aeX_04, reconstituant ainsi l'association échantillon-marqueur de taille présente dans les fichiers GENESCAN.

3 ANALYSE DES TRACÉS AFLP

Les paramètres de brillance, contraste, peuvent avoir un effet sur la détection des bandes par le logiciel. C'est pourquoi il nous paraît important de relater les différentes étapes de notre analyse.

Après avoir ouvert le fichier de données aeX_02 (ou aeX_03 si l'on analyse des données de fluorescence jaune), apparaît la fenêtre "1. Strips".

- Les valeurs choisies dans le menu "change brightness and contrast" sont :

Brightness = 3/10

Contrast = 5/10

Minimum = 0/10

Maximum = 10/10

- Dans la fenêtre "2. Curves/ Edit tone curve ", on choisit "linear", et l'on clique 3 fois sur "enhance weak bands" ; on choisit également le filtre médian.

- L'étape "3. Normalization" est effectuée grâce à la liaison avec le fichier aeX_04.

- Dans la fenêtre "4. Bands", les paramètres retenus dans le menu "Settings" sont :
minimum profiling = 5 ; minimum area = 0.0% ; shoulder sensitivity = 4.

Puis les bandes sont détectées par le logiciel (fonction "autosearch bands").

Le fichier est alors enregistré puis fermé.

4 ASSOCIATION ÉCHANTILLON-ISOLAT

Chaque piste du gel virtuel aeX_02 (visible dans la fenêtre "experiment data file") est associée à l'isolat qu'il représente, par glissement de la flèche "piste x" sur le nom d'isolat présent dans la base.

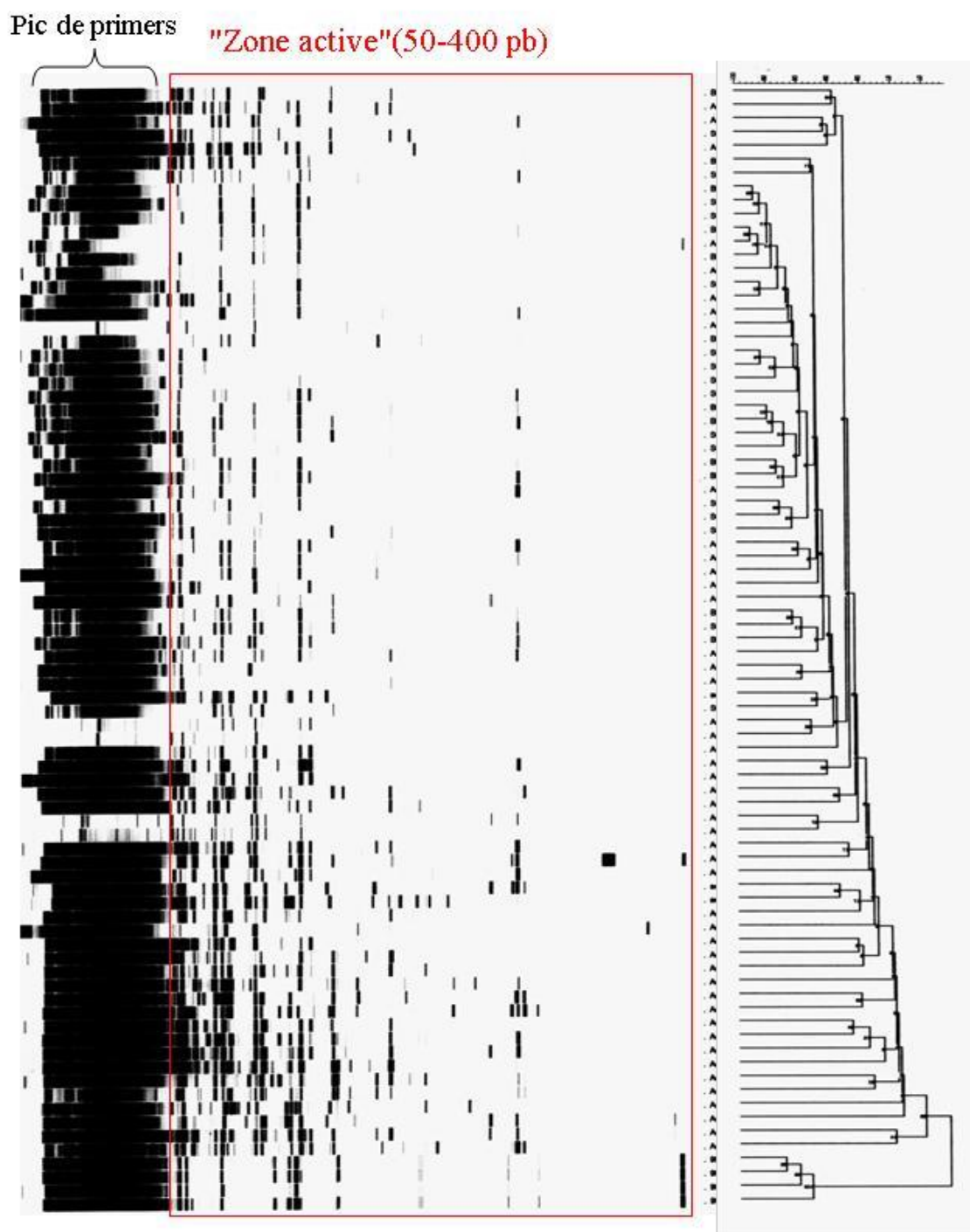
5 COMPARAISON D'ECHANTILLONS- CHOIX DES PARAMETRES DE COMPARAISON DE CHAQUE BANDE (BANDMATCHING)

- La comparaison des échantillons par Bionumerics est effectuée sous certaines conditions d'estimation de l'alignement entre bandes :
 - la tolérance de position est le décalage maximal entre deux bandes (en % de longueur du profil), autorisé pour considérer deux bandes comme de même taille.
 - l'optimisation est un décalage que l'on permet entre deux profils quelconques, et dans lesquels le programme va chercher la meilleure concordance possible.

Le logiciel peut calculer quels sont les meilleurs pourcentages de tolérance et d'optimisation adaptés aux données présentées, par la commande "Optimal position tolerance optimization and settings". Dans notre cas, le meilleur coefficient de tolérance a été trouvé à 0.15%, et le meilleur coefficient d'optimisation à 0.16%.

- Une "zone active dans la comparaison" est déterminée ; dans notre cas cette zone active est limitée à la plage 50-400 pb.

Annexe 8 Gel "virtuel" reconstitué par Bionumerics d'après les données ABI310
(marqueurs AFLP de la combinaison E+AAT/M+CTG)



Annexe 9 Matrice des marqueurs AFLP amplifiés par la combinaison Eco+AAT/Mse+CTG

suite

[illegible]

[illegible][illegible]

Annexe 11 Indices de Shannon calculés sur chaque locus présent dans les 4 phénotypes de virulence

		H'i								H'i							
LOCUS	PV	PVA	PVAF	PVAFB	H'pop	H'sp	G'st	LOCUS	PV	PVA	PVAF	PVAFB	H'pop	H'sp	G'st		
1	0,000	0,000	0,519	0,918	0,359	0,488	0,264	100	0,000	0,779	0,641	0,000	0,355	0,614	0,421		
2	0,000	0,779	0,990	0,000	0,442	0,999	0,557	101	0,811	0,996	1,000	0,918	0,931	0,999	0,068		
3	0,811	0,996	0,910	0,650	0,842	0,946	0,110	102	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379		
4	0,811	0,961	0,910	0,650	0,833	0,967	0,139	103	0,811	0,779	0,271	0,000	0,466	0,439	-0,059		
5	1,000	0,779	0,693	0,650	0,781	0,746	-0,047	104	0,811	0,391	0,000	0,000	0,301	0,196	-0,535		
6	1,000	0,996	0,996	0,918	0,978	0,997	0,020	105	0,000	0,391	0,159	0,000	0,138	0,196	0,297		
7	0,811	0,996	0,933	0,918	0,915	0,976	0,063	106	0,000	0,000	0,271	0,650	0,230	0,267	0,136		
8	0,000	0,890	0,820	0,000	0,428	0,773	0,447	107	0,000	0,391	0,159	0,918	0,367	0,330	-0,113		
9	0,811	0,779	0,740	0,000	0,583	0,716	0,186	108	0,000	0,619	0,365	0,650	0,409	0,439	0,070		
10	0,000	0,961	0,996	1,000	0,739	0,997	0,259	109	0,000	0,779	0,446	0,650	0,469	0,533	0,120		
11	0,811	0,779	0,740	0,650	0,745	0,746	0,000	110	0,000	0,000	0,271	0,650	0,230	0,267	0,136		
12	1,000	0,996	0,854	0,650	0,875	0,902	0,030	111	0,811	0,000	0,271	0,000	0,271	0,267	-0,015		
13	1,000	0,996	0,641	0,000	0,659	0,773	0,148	112	0,811	0,391	0,446	0,918	0,642	0,533	-0,205		
14	0,000	0,890	0,981	1,000	0,718	0,957	0,250	113	0,000	0,391	0,365	0,000	0,189	0,330	0,427		
15	0,000	0,391	0,933	1,000	0,581	0,866	0,329	114	0,811	0,391	0,365	0,000	0,392	0,387	-0,013		
16	0,811	0,961	0,641	0,918	0,833	0,773	-0,077	115	0,000	0,000	0,271	0,000	0,068	0,196	0,654		
17	0,811	0,961	0,782	0,650	0,801	0,823	0,027	116	0,811	0,890	0,271	0,650	0,656	0,533	-0,231		
18	1,000	0,000	0,365	0,650	0,504	0,439	-0,146	117	0,811	0,890	0,271	0,650	0,656	0,533	-0,231		
19	0,811	0,779	0,271	0,918	0,695	0,614	-0,133	118	0,000	0,391	0,159	0,000	0,138	0,196	0,297		
20	0,000	0,000	0,000	0,650	0,163	0,113	-0,435	119	0,000	0,619	0,159	0,000	0,195	0,267	0,270		
21	1,000	0,391	0,446	1,000	0,709	0,614	-0,156	120	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
22	1,000	0,619	0,740	0,650	0,752	0,746	-0,009	121	0,000	0,000	0,159	0,650	0,202	0,196	-0,033		
23	0,811	0,779	0,693	0,918	0,801	0,799	-0,002	122	1,000	0,391	0,365	0,918	0,669	0,533	-0,255		
24	0,811	0,961	0,519	0,918	0,802	0,716	-0,121	123	1,000	0,391	0,446	0,650	0,622	0,533	-0,167		
25	0,811	0,619	0,446	0,650	0,632	0,533	-0,186	124	0,000	0,619	0,159	0,000	0,195	0,267	0,270		
26	0,000	0,000	0,271	0,000	0,068	0,196	0,654	125	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379		
27	0,811	0,890	0,952	0,918	0,893	0,933	0,042	126	0,000	0,619	0,271	0,000	0,223	0,330	0,325		
28	0,811	0,779	0,854	0,918	0,841	0,845	0,005	127	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
29	0,000	0,391	0,693	0,650	0,434	0,614	0,293	128	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
30	0,000	0,391	0,693	0,918	0,501	0,650	0,230	129	1,000	0,996	0,952	0,918	0,967	0,967	0,001		
31	0,000	0,619	0,583	0,000	0,301	0,533	0,436	130	0,811	0,961	1,000	0,918	0,923	0,997	0,075		
32	1,000	0,779	0,910	1,000	0,922	0,918	-0,004	131	0,811	0,391	0,271	0,000	0,368	0,330	-0,117		
33	0,811	0,000	0,740	0,000	0,388	0,614	0,368	132	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379		
34	0,811	0,391	0,446	1,000	0,662	0,575	-0,152	133	0,811	0,391	0,159	0,650	0,503	0,330	-0,525		
35	1,000	0,961	0,820	0,918	0,925	0,885	-0,045	134	1,000	0,391	0,271	0,650	0,578	0,439	-0,316		
36	1,000	0,996	0,981	0,650	0,907	0,983	0,078	135	0,811	0,391	0,271	0,918	0,598	0,439	-0,361		
37	0,811	0,996	1,000	0,650	0,864	0,994	0,131	136	0,000	0,619	0,159	0,000	0,195	0,267	0,270		
38	0,811	0,996	1,000	0,918	0,931	0,997	0,066	137	1,000	0,996	0,365	0,650	0,753	0,684	-0,100		
39	0,000	0,619	0,583	0,000	0,301	0,533	0,436	138	0,000	0,000	0,000	0,650	0,163	0,113	-0,435		
40	0,811	0,961	0,740	0,918	0,858	0,823	-0,042	139	0,811	0,391	0,000	0,000	0,301	0,196	-0,535		
41	0,811	0,619	0,159	0,650	0,560	0,387	-0,447	140	0,000	0,391	0,000	0,000	0,098	0,113	0,137		
42	0,811	0,619	0,159	0,918	0,627	0,439	-0,427	141	0,000	0,890	0,583	0,918	0,598	0,684	0,126		
43	0,811	0,619	0,446	1,000	0,719	0,614	-0,172	142	0,000	0,391	0,365	0,000	0,189	0,330	0,427		
44	0,000	0,619	0,271	0,650	0,385	0,387	0,005	143	0,000	0,619	0,271	0,650	0,385	0,387	0,005		
45	0,811	0,000	0,000	0,000	0,203	0,113	-0,791	144	0,811	0,961	0,365	0,650	0,697	0,614	-0,136		
46	0,000	0,000	0,159	0,650	0,202	0,196	-0,033	145	0,000	0,391	0,000	0,000	0,098	0,113	0,137		
47	0,811	0,961	0,446	0,918	0,784	0,684	-0,147	146	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
48	0,811	0,779	0,740	1,000	0,833	0,799	-0,042	147	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
49	1,000	0,890	0,854	0,918	0,916	0,957	0,043	148	0,000	0,391	0,365	0,650	0,352	0,387	0,092		
50	0,811	0,961	0,583	0,000	0,589	0,746	0,210	149	0,000	0,391	0,446	0,650	0,372	0,439	0,154		
51	0,000	0,391	0,271	0,650	0,328	0,330	0,005	150	0,000	0,391	0,000	0,000	0,098	0,113	0,137		
52	0,811	0,000	0,854	1,000	0,666	0,799	0,166	151	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379		
53	0,000	0,391	0,583	0,918	0,473	0,575	0,177	152	0,000	0,391	0,000	0,000	0,098	0,113	0,137		
54	0,000	0,779	0,365	0,918	0,516	0,533	0,032	153	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
55	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379	154	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379		
56	1,000	0,996	0,820	0,650	0,867	0,885	0,021	155	0,811	0,391	0,271	0,000	0,368	0,330	-0,117		
57	0,811	0,996	0,996	1,000	0,951	0,999	0,048	156	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
58	0,811	0,996	0,910	1,000	0,929	0,946	0,017	157	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
59	0,000	0,890	0,693	1,000	0,646	0,773	0,165	158	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
60	0,000	0,890	0,641	0,918	0,612	0,773	0,208	159	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
61	0,000	0,000	0,271	0,000	0,068	0,196	0,654	160	0,000	0,000	0,000	0,650	0,163	0,113	-0,435		
62	0,000	0,391	0,271	0,000	0,166	0,267	0,379	162	0,811	0,000	0,000	0,000	0,203	0,113	-0,791		
63	0,000	0,391	0,159	0,650	0,300	0,267	-0,125	163	0,000	0,000	0,159	0,650	0,202	0,196	-0,033		
64	0,000	0,890	0,271	0,650	0,453	0,488	0,072	164	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648		
65	0,000	0,890	0,365	0,650	0,476	0,533	0,106	165	0,811	0,000	0,159	0,000	0,243	0,196	-0,239		
66	0,000	0,391	0,365	0,000	0,189	0,330	0,427	166	0,811	0,391	0,159	0,000	0,340	0,267	-0,276		
67	0,000	0,000	0,159	0,000	0,040	0,113	0,648	167	0,000	0,000	0,000	0,918	0,230	0,196	-0,172		
68	0,811	0,779	0,583	0,918	0,773	0,684	-0,130	168	0,000	0,000	0,000	0,650	0,163	0,113	-0,435		
69	0,811	0,619	0,820	1,000	0,813	0,823	0,013	169	0,000	0,000	0,000	0,918	0,230	0,196	-0,172		
70	1,000	0,961	0,740	1,000	0,925	0,866	-0,069	170	0,811	0,000	0,000	0,000	0,203	0,113	-0,791		
71	0,811	0,619	0,159	0,000	0,398	0,330	-0,205	171	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
72	0,000	0,000	0,271	1,000	0,318	0,387	0,179	172	0,000	0,391	0,159	0,000	0,138	0,196	0,297		
73	0,000	0,779	0,														

Annexe 12 Indices de Shannon calculés sur chaque locus

H'j							H'j						
LOCUS	A	B	C+D	H'pop	H'sp	G'st	LOCUS	A	B	C+D	H'pop	H'sp	G'st
1	0,503	0,575	0,000	0,359	0,509	0,294	92	0,000	0,439	0,503	0,314	0,404	0,223
2	0,918	0,999	0,991	0,969	0,999	0,030	93	0,503	0,000	0,000	0,168	0,119	-0,408
3	0,991	0,902	0,918	0,937	0,924	-0,015	96	0,503	0,156	0,000	0,220	0,206	-0,070
4	0,991	0,962	0,918	0,957	0,963	0,006	97	0,503	0,511	0,000	0,338	0,459	0,263
5	0,918	0,684	0,918	0,840	0,771	-0,090	98	0,000	0,575	0,764	0,446	0,555	0,196
6	0,991	0,994	0,991	0,992	0,997	0,005	99	0,764	0,976	0,918	0,886	0,951	0,069
7	0,991	0,926	0,991	0,969	0,973	0,004	100	0,000	0,575	0,918	0,498	0,598	0,167
8	0,764	0,731	0,918	0,804	0,771	-0,044	101	0,764	0,999	0,764	0,842	0,999	0,157
9	0,503	0,684	0,918	0,702	0,709	0,010	102	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082
10	0,991	0,962	0,918	0,957	0,993	0,036	103	0,000	0,359	0,764	0,374	0,404	0,074
11	0,991	0,632	0,764	0,796	0,741	-0,074	104	0,503	0,000	0,503	0,336	0,206	-0,632
12	0,991	0,773	0,991	0,918	0,869	-0,057	105	0,000	0,000	0,764	0,255	0,206	-0,239
13	0,918	0,575	0,991	0,828	0,741	-0,118	106	0,000	0,156	0,764	0,307	0,280	-0,098
14	0,503	1,000	0,503	0,669	0,963	0,305	107	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082
15	0,503	0,962	0,503	0,656	0,889	0,262	108	0,000	0,439	0,503	0,314	0,404	0,223
16	0,918	0,632	0,918	0,823	0,741	-0,111	109	0,000	0,575	0,503	0,359	0,509	0,294
17	0,503	0,684	0,991	0,726	0,771	0,058	110	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082
18	0,918	0,267	0,503	0,563	0,459	-0,227	111	0,503	0,267	0,000	0,257	0,280	0,082
19	0,918	0,439	0,764	0,707	0,598	-0,184	112	0,503	0,439	0,764	0,569	0,509	-0,119
20	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562	113	0,000	0,359	0,503	0,287	0,345	0,167
21	0,503	0,632	0,764	0,633	0,637	0,007	114	0,503	0,439	0,000	0,314	0,404	0,223
22	0,503	0,731	0,918	0,717	0,741	0,032	115	0,503	0,000	0,503	0,336	0,206	-0,632
23	0,764	0,731	0,991	0,829	0,798	-0,038	116	0,503	0,439	0,764	0,569	0,509	-0,119
24	0,503	0,575	0,991	0,690	0,674	-0,023	117	0,000	0,511	0,503	0,338	0,459	0,263
25	0,764	0,511	0,000	0,425	0,509	0,164	118	0,503	0,000	0,503	0,336	0,206	-0,632
26	0,503	0,156	0,000	0,220	0,206	-0,070	119	0,503	0,000	0,503	0,336	0,206	-0,632
27	0,991	0,926	0,764	0,894	0,938	0,048	120	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
28	0,918	0,876	0,503	0,766	0,847	0,096	121	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567
29	0,503	0,439	0,991	0,645	0,637	-0,011	122	0,764	0,575	0,000	0,446	0,555	0,196
30	0,764	0,439	0,991	0,732	0,637	-0,148	123	0,764	0,511	0,503	0,593	0,555	-0,068
31	0,000	0,359	0,991	0,450	0,509	0,115	124	0,000	0,000	0,503	0,168	0,119	-0,408
32	0,764	0,902	0,991	0,886	0,907	0,023	125	0,503	0,267	0,000	0,257	0,280	0,082
33	0,503	0,684	0,503	0,564	0,637	0,116	126	0,503	0,267	0,000	0,257	0,280	0,082
34	0,503	0,632	0,503	0,546	0,598	0,086	127	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
35	0,764	0,845	0,991	0,867	0,869	0,003	128	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
36	0,764	0,976	0,991	0,910	0,973	0,064	129	0,991	0,946	0,991	0,976	0,963	-0,014
37	0,918	0,994	0,503	0,805	0,993	0,189	130	0,918	0,994	0,918	0,944	0,999	0,056
38	0,764	0,994	0,918	0,892	0,997	0,105	131	0,000	0,359	0,000	0,120	0,280	0,572
39	0,503	0,511	0,764	0,593	0,555	-0,068	132	0,000	0,156	0,503	0,220	0,206	-0,070
40	0,991	0,575	0,918	0,828	0,824	-0,005	133	0,503	0,267	0,000	0,257	0,280	0,082
41	0,503	0,267	0,764	0,511	0,404	-0,264	134	0,503	0,439	0,503	0,482	0,459	-0,051
42	0,503	0,359	0,764	0,542	0,459	-0,182	135	0,764	0,359	0,503	0,542	0,459	-0,182
43	0,764	0,439	0,918	0,707	0,598	-0,184	136	0,000	0,359	0,000	0,120	0,280	0,572
44	0,503	0,359	0,000	0,287	0,345	0,167	137	0,764	0,632	0,764	0,720	0,674	-0,068
45	0,503	0,000	0,000	0,168	0,119	-0,408	138	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
46	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567	139	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567
47	0,503	0,575	0,991	0,690	0,674	-0,023	140	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
48	0,764	0,811	0,764	0,780	0,798	0,023	141	0,503	0,575	0,991	0,690	0,674	-0,023
49	0,991	0,876	0,991	0,953	0,938	-0,015	142	0,000	0,156	0,918	0,358	0,345	-0,038
50	0,503	0,632	0,918	0,685	0,674	-0,015	143	0,000	0,359	0,503	0,287	0,345	0,167
51	0,503	0,267	0,503	0,424	0,345	-0,230	144	0,000	0,511	0,918	0,476	0,555	0,141
52	0,503	0,926	0,000	0,476	0,824	0,422	146	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
53	0,000	0,684	0,000	0,228	0,555	0,589	147	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
54	0,000	0,575	0,503	0,359	0,509	0,294	148	0,000	0,359	0,503	0,287	0,345	0,167
55	0,000	0,359	0,000	0,120	0,280	0,572	149	0,000	0,439	0,503	0,314	0,404	0,223
56	0,503	0,811	0,918	0,744	0,869	0,144	150	0,000	0,000	0,503	0,168	0,119	-0,408
57	0,918	1,000	0,991	0,970	0,999	0,029	151	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082
58	0,503	0,976	0,918	0,799	0,938	0,148	152	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
59	0,764	0,773	0,764	0,767	0,771	0,004	153	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
60	0,764	0,684	0,991	0,813	0,798	-0,019	154	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082
61	0,000	0,156	0,503	0,220	0,206	-0,070	155	0,764	0,000	0,764	0,509	0,345	-0,476
62	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082	156	0,000	0,000	0,503	0,168	0,119	-0,408
63	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082	158	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
64	0,000	0,439	0,918	0,453	0,509	0,110	159	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
65	0,503	0,439	0,764	0,569	0,509	-0,119	160	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
66	0,503	0,156	0,503	0,388	0,280	-0,387	162	0,503	0,000	0,000	0,168	0,119	-0,408
67	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562	163	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567
68	0,764	0,632	0,764	0,720	0,674	-0,068	164	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
69	0,918	0,845	0,503	0,756	0,824	0,083	165	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567
70	0,918	0,773	0,991	0,894	0,847	-0,055	166	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567
71	0,000	0,359	0,503	0,287	0,345	0,167	167	0,503	0,156	0,000	0,220	0,206	-0,070
72	0,000	0,511	0,000	0,170	0,404	0,579	168	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
73	0,000	0,359	0,764	0,374	0,404	0,074	169	0,503	0,156	0,000	0,220	0,206	-0,070
74	0,000	0,359	0,503	0,287	0,345	0,167	170	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
75	0,764	0,946	0,918	0,876	0,963	0,090	172	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
76	0,764	0,773	0,991	0,843	0,824	-0,023	173	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
77	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567	174	0,000	0,439	0,503	0,314	0,404	0,223
78	0,000	0,511	0,000	0,170	0,404	0,579	175	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
79	0,503	0,632	0,764	0,633	0,637	0,007	176	0,000	0,267	0,503	0,257	0,280	0,082
80	0,764	0,731	0,918	0,804	0,771	-0,044	177	0,918	0,962	0,764	0,882	0,938	0,060
81	0,764	0,632	0,991	0,796	0,741	-0,074	178	0,991	0,946	0,764	0,900	0,951	0,054
82	0,000	0,731	0,991	0,574	0,741	0,225	179	0,503	0,632	0,918	0,685	0,674	-0,015
83	0,764	0,267	0,764	0,598	0,459	-0,305	180	0,000	0,267	0,000	0,089	0,206	0,567
84	0,000	0,511	0,000	0,170	0,404	0,579	183	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
85	0,503	0,359	0,503	0,455	0,404	-0,125	185	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
86	0,000	0,000	0,503	0,168	0,119	-0,408	186	0,503	0,000	0,000	0,168	0,119	-0,408
87	0,503	0,267	0,503	0,424	0,345	-0,230	187	0,000	0,156	0,000	0,052	0,119	0,562
88	0,503	0,994	0,764	0,754	0,951	0,208	188	0,000	0,000	0,503	0,168	0,119	-0,408
89	0,000	0,987	0,764	0,58									

H'pop = calculés sur les 3 groupes

H'sp = calculés sur les 62 isolats testés

$$G'st = 1 - (H'_{pop}/H'_{sp})$$

Annexe 13 Indices de Shannon calculés sur chaque locus présents dans les différentes populations de parcelles, de bassins, collection nationale et internationale

H'i										H'j									
Loci	EPB	Centre	Bretagne	Fretay	Clignacourt	France	H'pop	H'sp	G'st	Loci	EPB	Centre	Bretagne	Fretay	Clignacourt	France	H'pop	H'sp	G'st
1	0,323	0,000	0,523	0,544	0,414	0,330	0,282	0,499	0,436	99	0,937	0,722	0,998	0,989	0,980	0,967	0,885	0,996	0,111
2	0,874	0,971	0,937	0,544	0,918	0,999	0,927	0,996	0,069	100	0,672	0,971	0,523	0,696	0,000	0,614	0,722	0,569	-0,269
3	0,937	0,722	0,937	0,954	0,650	0,946	0,865	0,937	0,077	101	1,000	0,971	0,998	1,000	0,980	0,999	0,989	0,984	-0,005
4	0,960	0,971	0,977	0,696	0,980	0,967	0,969	0,937	-0,034	102	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,064	0,226	0,718
5	0,734	0,722	0,672	0,337	0,414	0,684	0,709	0,712	0,004	103	0,191	0,000	0,523	0,000	0,000	0,330	0,238	0,535	0,555
6	0,937	0,971	0,937	0,696	0,918	0,994	0,948	0,998	0,050	104	0,191	0,000	0,323	0,000	0,000	0,196	0,171	0,378	0,546
7	0,908	0,722	0,998	0,544	1,000	0,967	0,876	0,979	0,105	105	0,000	0,722	0,000	0,000	0,000	0,196	0,241	0,165	-0,455
8	0,734	0,000	0,998	0,544	0,980	0,845	0,577	0,856	0,326	106	0,000	0,971	0,000	0,000	0,000	0,196	0,324	0,226	-0,429
9	0,672	0,000	0,937	0,544	0,918	0,773	0,536	0,781	0,313	107	0,323	0,722	0,000	0,000	0,000	0,267	0,348	0,499	0,302
10	0,908	0,722	0,937	0,696	0,980	0,994	0,856	1,000	0,144	108	0,431	0,000	0,523	0,337	0,414	0,387	0,318	0,535	0,406
11	0,672	0,971	0,874	0,337	0,811	0,823	0,839	0,801	-0,047	109	0,602	0,000	0,523	0,544	0,414	0,488	0,375	0,601	0,376
12	0,787	0,971	0,998	0,337	0,980	0,918	0,919	0,926	0,008	110	0,323	0,722	0,000	0,337	0,000	0,267	0,348	0,331	-0,051
13	0,672	0,971	0,937	0,000	0,811	0,823	0,860	0,839	-0,025	111	0,431	0,000	0,000	0,337	0,000	0,267	0,144	0,281	0,490
14	0,960	0,000	0,977	0,954	1,000	0,957	0,646	0,979	0,340	112	0,602	0,722	0,323	0,337	0,000	0,533	0,549	0,535	-0,026
15	0,908	0,000	0,874	0,989	0,980	0,866	0,594	0,872	0,319	113	0,323	0,000	0,323	0,337	0,000	0,267	0,215	0,331	0,351
16	0,602	0,722	0,672	0,337	0,414	0,746	0,666	0,781	0,148	114	0,431	0,000	0,323	0,000	0,000	0,330	0,251	0,331	0,242
17	0,874	0,971	0,523	0,811	0,000	0,823	0,789	0,781	-0,010	115	0,323	0,000	0,000	0,000	0,000	0,196	0,108	0,378	0,715
18	0,323	0,722	0,672	0,000	0,414	0,439	0,572	0,535	-0,070	116	0,431	0,722	0,523	0,000	0,000	0,488	0,558	0,601	0,070
19	0,323	0,971	0,787	0,000	0,414	0,716	0,694	0,712	0,026	117	0,523	0,971	0,323	0,337	0,000	0,533	0,605	0,499	-0,213
20	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,095	1,000	118	0,191	0,722	0,323	0,000	0,000	0,267	0,412	0,331	-0,244
21	0,323	0,971	0,672	0,000	0,414	0,575	0,655	0,631	-0,039	119	0,323	0,722	0,323	0,000	0,000	0,330	0,456	0,461	0,012
22	0,672	0,722	0,874	0,544	0,650	0,746	0,756	0,736	-0,027	120	0,000	0,722	0,000	0,000	0,000	0,113	0,241	0,226	-0,063
23	0,787	0,722	0,672	0,544	0,414	0,773	0,727	0,781	0,069	121	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,165	1,000
24	0,672	0,971	0,523	0,337	0,414	0,716	0,722	0,736	0,020	122	0,602	0,722	0,000	0,000	0,000	0,488	0,441	0,499	0,116
25	0,602	0,722	0,523	0,544	0,414	0,533	0,616	0,631	0,024	123	0,602	0,722	0,323	0,000	0,414	0,533	0,549	0,631	0,130
26	0,191	0,000	0,323	0,000	0,414	0,196	0,171	0,165	-0,036	124	0,191	0,722	0,523	0,000	0,414	0,330	0,479	0,461	-0,038
27	0,937	0,722	0,977	0,954	0,980	0,976	0,879	0,979	0,102	125	0,323	0,722	0,323	0,000	0,000	0,330	0,456	0,281	-0,621
28	0,874	0,722	0,937	0,954	0,918	0,885	0,844	0,872	0,032	126	0,431	0,000	0,323	0,000	0,000	0,330	0,251	0,281	0,107
29	0,323	0,722	0,672	0,000	0,650	0,533	0,572	0,535	-0,070	127	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,064	0,095	0,328
30	0,523	0,971	0,523	0,000	0,650	0,614	0,672	0,569	-0,182	128	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,095	1,000
31	0,431	0,971	0,523	0,337	0,000	0,533	0,641	0,631	-0,017	129	0,874	0,722	0,998	0,696	1,000	0,967	0,864	0,965	0,104
32	0,874	0,971	0,874	0,954	0,811	0,933	0,906	0,937	0,033	130	1,000	0,722	0,998	0,989	1,000	0,999	0,906	1,000	0,093
33	0,672	0,722	0,672	0,896	0,650	0,650	0,689	0,759	0,093	131	0,323	0,722	0,000	0,544	0,000	0,330	0,348	0,378	0,078
34	0,523	0,971	0,323	0,337	0,414	0,650	0,605	0,736	0,178	132	0,431	0,000	0,000	0,000	0,000	0,267	0,144	0,226	0,366
35	0,908	0,971	0,523	0,544	0,000	0,799	0,801	0,872	0,082	133	0,323	0,722	0,323	0,000	0,000	0,330	0,456	0,421	-0,083
36	0,998	0,971	0,874	0,989	0,650	0,967	0,947	0,965	0,018	134	0,323	0,971	0,323	0,000	0,000	0,488	0,539	0,461	-0,168
37	0,977	0,722	0,998	0,989	1,000	0,994	0,899	1,000	0,101	135	0,523	0,000	0,323	0,000	0,000	0,439	0,282	0,378	0,254
38	0,990	0,971	0,998	1,000	0,980	0,994	0,986	0,996	0,010	136	0,323	0,722	0,000	0,337	0,000	0,267	0,348	0,461	0,245
39	0,431	0,971	0,672	0,544	0,414	0,650	0,691	0,631	-0,096	137	0,672	0,722	0,323	0,337	0,000	0,650	0,572	0,601	0,047
40	0,787	0,971	0,787	0,337	0,414	0,845	0,848	0,821	-0,034	138	0,000	0,722	0,000	0,000	0,000	0,196	0,241	0,226	-0,063
41	0,000	0,722	0,323	0,000	0,000	0,267	0,348	0,331	-0,051	139	0,323	0,722	0,323	0,000	0,196	0,108	0,226	0,525	0,525
42	0,191	0,971	0,523	0,000	0,000	0,387	0,562	0,421	-0,335	140	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,064	0,095	0,328
43	0,431	0,971	0,523	0,337	0,000	0,488	0,641	0,569	-0,128	141	0,602	0,971	0,523	0,337	0,414	0,614	0,699	0,736	0,051
44	0,323	0,722	0,000	0,337	0,000	0,267	0,348	0,378	0,078	142	0,323	0,000	0,323	0,337	0,414	0,330	0,215	0,461	0,533
45	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,064	0,281	0,773	143	0,431	0,722	0,323	0,000	0,000	0,387	0,492	0,378	-0,302
46	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,461	1,000	144	0,523	0,722	0,523	0,000	0,000	0,575	0,589	0,631	0,066
47	0,602	0,722	0,323	0,000	0,000	0,533	0,549	0,736	0,054	145	0,191	0,000	0,523	0,000	0,000	0,113	0,064	0,095	0,328
48	0,672	0,971	0,672	0,337	0,414	0,684	0,772	0,736	-0,048	146	0,000	0,000	0,323	0,000	0,000	0,113	0,064	0,095	-0,132
49	0,937	0,722	0,874	0,337	0,650	0,946	0,844	0,972	0,132	147	0,000	0,000	0,323	0,000	0,000	0,113	0,108	0,378	0,715
50	0,834	0,722	0,672	0,337	0,414	0,773	0,743	0,856	0,133	148	0,191	0,971	0,323	0,000	0,000	0,488	0,495	0,569	0,130
51	0,431	0,722	0,323	0,000	0,000	0,439	0,492	0,378	-0,302	149	0,323	0,971	0,323	0,000	0,000	0,533	0,539	0,499	-0,079
52	0,834	0,722	0,523	1,000	0,414	0,845	0,693	0,914	0,242	150	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,000	0,095	1,000
53	0,734	0,722	0,000	0,896	0,000	0,533	0,485	0,712	0,319	151	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,196	0,064	0,226	0,718
54	0,431	0,000	0,323	0,000	0,000	0,439	0,251	0,569	0,558	152	0,191	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,064	0,226	0,718
55	0,323	0,000	0,000	0,337	0,000	0,196	0,108	0,226	0,525	153	0,191	0,722	0,000	0,000	0,000	0,196	0,304	0,165	-0,840
56	0,960	0,971	0,323	0,896	0,000	0,866	0,751	0,856	0,123	154	0,431	0,722	0,000	0,000	0,000	0,330	0,384	0,461	0,167
57	0,990	0,722	0,977	1,000	0,918	0,997	0,896	0,984	0,089	155	0,191	0,000	0,523	0,000	0,414	0,330	0,238	0,331	0,282
58	0,960	0,971	0,977	0,954	0,918	0,946	0,969	0,937	-0,034	156	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,095	1,000
59	0,672	0,971	0,787	0,337	0,811	0,746	0,810	0,759	-0,067	157	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,113	0,000	0,095	1,000
60	0,431	0,722	0,323	0,000	0,000	0,811	0,746	0,647	0,872	158	0,000	0,000	0,323	0,000	0,000	0,196	0,108	0,226	0,525
61	0,000	0,722	0,323																

RESUME : La pourriture racinaire causée par *Aphanomyces euteiches* est apparue brusquement sur pois en France, causant de gros dégâts. Une étude de diversité de populations françaises d' *A.euteiches* a été menée pour mieux comprendre l'origine de cette brutale épidémie, et pour contribuer à la mise en place de stratégies de lutte efficaces et durables.

La variabilité de spécificité d'hôte sur Légumineuses a d'abord été estimée par inoculation de la collection française et d'isolats-référence étrangers sur pois, vesce commune, luzerne, féverole et haricot. Il apparaît que les isolats français sont préférentiellement pathogènes sur pois mais ne sont pas spécialisés sur cette espèce. Un type majoritaire a été mis en évidence (attaquant pois, vesce, luzerne et féverole), ainsi que 10% d'isolats polyphages. Les isolats étrangers piégés sur d'autres Légumineuses apparaissent en revanche beaucoup plus spécialisés sur leur hôte.

L'étude de variabilité de virulence sur pois a nécessité la mise au point d'une nouvelle gamme différentielle à six génotypes. Onze types de virulence ont été mis en évidence, dont un est très majoritaire en France. Les isolats français se distinguent par leur agressivité plus élevée, et par leur virulence sur des lignées résistantes à certains isolats étrangers, notamment américains.

Des marqueurs AFLP ont révélé une très forte variabilité génotypique des populations françaises d' *A.euteiches* à toutes les échelles d'étude, suggérant leur caractère endémique et un fort taux de recombinaison. Elles ne sont en revanche structurées ni par leur degré de spécificité d'hôte, ni par la géographie. La structure de population de ce champignon tellurique apparaît par contre fortement homothallique. Certaines pistes d'explication de ce paradoxe sont proposées.

Cette étude est la première étude de diversité réalisée sur ce champignon à cette échelle (parcellaire, nationale et internationale). Elle ouvre de nombreuses perspectives, notamment dans la gestion des rotations, et dans la sélection variétale pour la résistance à *A.euteiches*.

TITLE : **Biological and genotypical diversity of the french populations of *Aphanomyces euteiches* Drechs., the agent of the common root rot of pea**

ABSTRACT : The common root rot of pea recently appeared in France, causing big damages in the major pea-producing areas. For a better understanding of the origin of this epidemic, and to search for breeding and cultural solutions, the pathogenic and molecular variability of the french populations of *A.euteiches* had to be investigated.

The host specificity of a french collection of isolates, as well as some reference isolates from foreign countries, was estimated by their pathogenicity on pea, common vetch, alfalfa, faba bean and snap bean. It appeared that the french isolates were preferentially pathogenic on pea, but not specialised on this species, most of them attacking also vetch, alfalfa and faba bean. 10% of the isolates exhibited a broad-host range. The foreign isolates from other legume species were much more specialized to their host.

To investigate the variability in virulence on pea of the *A.euteiches* french populations, a new set of differential genotypes was set up. Eleven virulence types were characterised, but a type highly predominated, virulent on the whole set and aggressive. The french isolates appeared to be more aggressive than the foreign isolates, and were virulent on some lines found resistant to foreign isolates.

AFLP markers revealed a very high genotypical diversity within the french isolates, suggesting the endemic origin of the *A.euteiches* inoculum and a great amount of outcrossing. The French populations were found to be structured neither by their host specificity, nor by geography. However, the population structure of this soilborne fungus was found to be strongly homothallic. Hypotheses to explain this paradox are proposed.

This study was the first one to investigate the population diversity of this fungus at this scale of study. It has many agronomical repercussions, regarding cultural control methods, and breeding strategies for *A.euteiches* resistance in pea.

DISCIPLINE : Pathologie végétale

MOTS-CLE : *Aphanomyces euteiches*, Leguminosae, *Pisum sativum*, spécificité d'hôte, virulence, structure de populations

LABORATOIRE D'ACCUEIL : INRA- Centre de recherche agronomique de Rennes, UMR "Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes" (BiO3P), Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 LE RHEU Cédex, FRANCE
